



Les récepteurs venus kinase (VKRs) de schistosoma mansoni : étude des voies de signalisation de SmVKR1 et rôle de la protéine adaptatrice SmShb

Marion Morel

► To cite this version:

Marion Morel. Les récepteurs venus kinase (VKRs) de schistosoma mansoni : étude des voies de signalisation de SmVKR1 et rôle de la protéine adaptatrice SmShb. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. <NNT : 2016LIL2S003>. <tel-01376274>

HAL Id: tel-01376274

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01376274>

Submitted on 4 Oct 2016

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

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

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ
École 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 : Biologie moléculaire et structurale, biochimie

Présentée et soutenue publiquement par

Marion MOREL

Le 23 mars 2016

Les récepteurs Venus Kinase (VKRs) de *Schistosoma mansoni* : étude des voies de signalisation de SmVKR1 et rôle de la protéine adaptatrice SmShb

Devant le jury composé de :

Président : **Professeur El Moukhtar ALIOUAT**

Rapporteurs : **Docteur Gerald SPAETH**
Docteur David DUVAL

Examineurs : **Docteur Christian MITRI**
Docteur Jérôme VICOONE
Docteur Colette DISSOUS

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Université Lille Nord de France – INSERM U1019 – CNRS UMR 8204
Institut Pasteur de Lille
1 rue du Professeur Calmette 59019 Lille Cedex France

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Camille Locht, directeur du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de cette structure.

Je remercie les Docteurs Raymond Pierce et Jamal Khalife pour leur accueil au sein de l'équipe 2, leur gentillesse et leurs recommandations au cours de ma thèse.

Je remercie également le Professeur El Moukhtar Aliouat de me faire le plaisir de présider mon jury de thèse ainsi que les Docteurs Gerald Spaeth et David Duval d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également le Docteur Christian Mitri pour avoir accepté d'être examinateur de mon travail de thèse.

Merci au Docteur Jérôme Vicogne pour avoir également accepté de faire partie du jury et pour avoir suivi mon travail au cours de toutes ces années. Merci pour ton implication et tous tes conseils avisés.

Un grand merci au Docteur Colette Dissous. Je vous remercie pour votre grande disponibilité, vos nombreux conseils et votre confiance. Vous m'avez guidée dans ce travail tout en me laissant la liberté d'y apporter ma propre vision. Merci également de m'avoir permis de participer à divers congrès internationaux. Ces années à vos côtés ont été très enrichissantes et m'ont beaucoup appris.

Merci aussi au Docteur Katia Cailliau pour tout le travail effectué en ovocytes de xénope. Merci également d'avoir suivi mon travail de près pendant toute sa durée.

Je remercie également le Professeur Christoph Grevelding pour ses nombreux conseils et avis constructifs.

J'aimerais également adresser un merci tout particulier au Docteur Mathieu Vanderstraete qui m'a encadré lors de mes premières années au labo. Mathieu, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir tant appris techniquement et scientifiquement. Travailler avec toi a été un vrai plaisir.

Merci aussi à tous les collègues et amis qui ont été présents durant ma thèse. Julien, merci pour tous les moments passés ensemble : les sorties, les concerts, mais aussi les manips en duo sont toujours un plaisir ! Gégé, Laetitia et Adeline, merci pour toutes nos sorties et discussions qui nous ont permis de nous soutenir tout au long de ces années. Stéphanie, merci pour ton aide et toutes tes réponses à mes questions. Merci également à mes coloc' de bureaux Lucile, Astrid, Bénédicte, Thomas, Alejandro. Merci à vous tous pour tous les bons moments passés avec vous aussi bien au labo qu'en dehors. Sans vous tous, ces années n'auraient pas été les mêmes.

Merci également à tous les autres membres de l'équipe 2 et à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au cours de ces 4 ans : Nadège, Marie-Jo, Jacques, Claudine, Manu, Nico, Vitor, Audrey, Christine, Caro, Sophia, Anne.

Merci également à tous mes amis qui m'ont toujours soutenus, de près comme de loin. Merci à Léa, Camille, Marc, Justine, Aurélien, Florie, Florian, Corinne et Manue. Pouet à Cécile et Chloé.

Enfin, j'adresse un énorme merci à toute ma famille pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté au long de ces années.

Merci à tous !

RÉSUMÉ

La schistosomiase est une parasitose causée par un ver plat trématode du genre *Schistosoma*. Cette pathologie, responsable de près de 300 000 décès par an, est essentiellement due à la forte fécondité des vers et à l'accumulation des œufs dans les tissus de l'hôte. Pour lutter contre la pathologie, un seul traitement efficace, le Praziquantel, est utilisé en masse dans les régions endémiques. Afin de parer à l'apparition de résistances au Praziquantel, le développement de molécules régulant la ponte du parasite fait partie des solutions alternatives envisagées.

Les récepteurs Venus Kinase (VKRs) forment une famille de récepteurs tyrosine kinase (RTKs) spécifique des invertébrés découverte au laboratoire chez le parasite *Schistosoma mansoni*. Les VKRs possèdent une structure atypique associant un domaine extracellulaire de fixation au ligand de type Venus Flytrap (VFT) associé à un domaine Tyrosine Kinase (TK) intracellulaire. Deux VKRs sont exprimés chez *S. mansoni* : SmVKR1 et SmVKR2. Ces deux récepteurs activent les voies de signalisation ERK, Akt et JNK et jouent un rôle dans la reproduction du parasite.

Du fait de leur absence dans le génome de l'Homme, et de leur rôle potentiel dans la modulation de la reproduction et du développement des parasites, les SmVKRs constituent des cibles intéressantes pour lutter contre la schistosomiase.

La première partie de mon travail de thèse expose les données acquises quant au rôle des RTKs dans la régulation de la reproduction des schistosomes. Nous avons pu montrer que la conservation des domaines catalytiques des différents RTKs ouvre la voie à l'élaboration de molécules pouvant inhiber simultanément plusieurs RTKs de schistosomes afin de lutter contre la schistosomiase en agissant sur la ponte du parasite.

La seconde partie de mon travail met en évidence qu'en plus d'agir directement sur l'activité des RTKs, il est possible d'inhiber les voies qu'ils activent. En effet, un criblage d'inhibiteurs de protéines kinases a permis d'identifier les composants de la voie Akt comme cibles potentielles pour lutter contre la schistosomiase : des doses très faibles (de l'ordre du nM) de certains inhibiteurs d'Akt sont capables d'inhiber l'appariement des schistosomes et la ponte.

Dans la dernière partie, nous montrons que la protéine adaptatrice SmShb interagit spécifiquement avec SmVKR1 phosphorylé. Cette interaction se fait par la liaison du domaine SH2 de SmShb sur une Tyrosine phosphorylée spécifique, située dans la région juxtamembranaire du récepteur (pY979). La formation de ce complexe induit la phosphorylation de SmShb et dirige le signal de SmVKR1 spécifiquement vers la voie JNK. Des expériences d'hybridation *in situ* ont mis en évidence une colocalisation des transcrits de *SmShb* avec ceux de *Smvkr1* au niveau des organes reproducteurs des vers adultes, notamment au niveau des ovocytes matures et des testicules. Le knock-down de *SmShb* par ARN interférence conduit à une accumulation de spermatozoïdes dans les testicules des vers mâles. Parallèlement, un criblage par la technique du triple hybride, en utilisant SmShb phosphorylé par SmVKR1 comme appât, a permis l'identification de diverses protéines partenaires de SmShb. En raison des résultats précédents, notre attention s'est portée sur deux protéines partenaires pour lesquelles l'interaction avec SmShb a été confirmée. 1) La GTPase RhoU, qui possède des fonctions potentielles dans la signalisation JNK et sur la dynamique du cytosquelette. 2) Une chaîne légère de la dynéine TcTex-1 possédant un rôle potentiel dans la motilité des spermatozoïdes. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de SmShb dans la régulation de l'activité de SmVKR1 en permettant la formation d'un complexe multi-protéique incluant des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematode flatworm species belonging to the genus *Schistosoma*. Responsible for about 300,000 deaths per year, the disease is mainly due to the high fertility of the worms and to encystment of eggs in host tissues. In order to fight against schistosomiasis, a single drug (Praziquantel) is efficient and massively distributed in endemic areas. To deal with the emergence of resistance to Praziquantel, one alternative is to consider the design of molecules that target parasite reproduction.

Venus Kinase Receptors (VKRs) constitute an invertebrate Receptor Tyrosine Kinase (RTK) family initially discovered in the parasite *Schistosoma mansoni*. VKRs are atypical RTKs formed by an extracellular Venus Fly Trap (VFT) ligand binding domain associated *via* a transmembrane domain with an intracellular tyrosine kinase (TK) domain. Two VKRs are expressed in *S. mansoni*: SmVKR1 and SmVKR2. They both activate Erk, Akt and JNK signaling pathways and act on the parasite reproduction. As they are absent from the human genome and as they have potential roles in the modulation of reproductive processes and development of parasites, SmVKRs appear as attractive targets to fight schistosomiasis.

The first part of my thesis work sets known data concerning the role of RTKs in schistosome reproduction. Here, we show that the catalytic domains are conserved across various RTKs and we open the perspective to design drugs which could inhibit several RTKs at the same time to control egg laying by schistosomes.

The second part of my work describes the importance of using an alternative strategy of inhibiting downstream partners of RTKs. By screening a kinase inhibitor library, we defined the Akt pathway components as potential targets to fight schistosomiasis. Nanomolar doses of Akt inhibitors can inhibit schistosome pairing and egg laying.

In the last part, we present the specific interaction of the adaptor protein SmShb with the phosphorylated form of SmVKR1. This binding occurs between the SH2 domain of SmShb and a phosphotyrosine residue (pY979) located in the juxtamembrane region of the receptor. That interaction leads to the phosphorylation of SmShb and promotes the signal of SmVKR1 towards a JNK pathway. *In situ* hybridization experiments highlighted that *SmShb* and *Smvkr1* transcripts were both located in mature oocytes and testes of adult worms. RNA interference experiments using double-stranded RNA targeting *SmShb* led to an accumulation of mature sperm in testes of male worms. Finally, a yeast three hybrid screening, using SmShb phosphorylated by SmVKR1 as prey, allowed us to identify various protein partners. Taking advantage of previous results, we focused on two partners and confirmed their interaction with SmShb. 1) RhoU GTPase which has potential functions in JNK signalling and cytoskeleton dynamic. 2) The dynein light chain TcTex-1, with potential role in sperm motility. Altogether, this results argue for a potential role of SmShb in the regulation of the SmVKR1 activity by forming a multiprotein complex including proteins with various roles in cytoskeleton reorganization.

Marion Morel

Date of birth: 17/09/1987 in Hirson, France (02)
Languages: French (native), English
Citizenship: French

5 rue Newton, 59000 Lille, FRANCE
Tel: +33 6 50 82 36 24
marionmorel7@gmail.com

EDUCATION AND PROFESSIONAL EXPERIENCE

2012 – Present: PhD student in biology and health sciences, Lille 2 University, France.

Research work in the Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL) - Team 2: "Molecular Signalling and the control of parasitic Growth and Differentiation".
Supervisor: Dr Colette Dissous

Thesis title: *Schistosoma mansoni* Venus Kinase Receptors (VKRs): SmVKR1 signaling pathways and role of the adaptor protein SmShb.

Defense scheduled on March 23rd 2016

2013: D.U. (Academic degree) in Cellular Microbiology, Lille 2 University, France.

2012: Master degree of Biology and Health Sciences, Lille 2 University, France.

Research work in the CIIL - Team 2. Supervisor: Dr Colette Dissous

Master thesis title: Clonage and characterization of SmShb, a potential partner of the receptor SmVKR1 of *Schistosoma mansoni*.

2011: Master (MSc) of Biology and Biotechnology, genetics and microbiology option, Lille 1 University, France.

Internship (6 weeks) in the CIIL - Team 2. Supervisor: Dr Colette Dissous.
Study of the Polo-Like Kinases of *Schistosoma mansoni*.

2010: Licence (BSc) of cell biology and physiology, genetics, microbiology and cell biology option, Lille 1 University, France.

TECHNICAL SKILLS

Molecular biology and biochemistry:

- Cloning strategies, plasmid DNA extraction, RNA extraction, Real time RT-PCR, RACE PCR, site-directed mutagenesis, yeast two-hybrid system.
- Protein production, protein extraction, immunoprecipitation, Western Blot.
- Production on double stranded RNA, RNA interference, production of mRNA.

Bioinformatics analysis:

- Bioinformatic softwares for nucleotide and protein sequence analyses and for phylogenetic studies: Bioedit, Clustal W, Prosite/Expasy, NCBI BLAST, SMART, MEGA6, DNASTAR Lasergene pack (EditSeq, SeqBuilder, Seqman, Mapdraw), ABI sequence detection system.

Others:

- Confocal and light microscopy.
- Preparation of *Schistosoma mansoni* miracidia and cercariae, *in vitro* culture of schistosomula, sporocysts and adult worms.
- Cell culture



PUBLICATIONS

- Morel, M**, Vanderstraete, M, Cailliau, K, Hahnel, S, Grevelding, CG, Dissous, C (2016) SmShb, the SH2-containing adaptor protein B of *Schistosoma mansoni* mediates a JNK pathway dependent on Venus Kinase Receptor. *PLoS Pathog*. Submitted.
- Morel, M**, Vanderstraete, M, Cailliau, K, Lescuyer, A, Lancelot, J, Dissous, C. (2014) Compound library screening identified Akt/PKB kinase pathway inhibitors as potential key molecules for the development of new chemotherapeutics against schistosomiasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 4(3):256-66. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.09.004.
- Morel, M**, Vanderstraete, M, Hahnel, S, Grevelding, CG, Dissous, C. (2014) Receptor tyrosine kinases and schistosome reproduction: new targets for chemotherapy. *Front Genet*. 5:238. doi: 10.3389/fgene.2014.00238.
- Hahnel, S, Quack, T, Parker-Manuel, SJ, Lu, Z, Vanderstraete, M, **Morel, M**, Dissous, C, Cailliau, K, Grevelding, CG. (2014) Gonad RNA-specific qRT-PCR analyses identify genes with potential functions in schistosome reproduction such as SmFz1 and SmFGFRs. *Front Genet*. 5:170. doi: 10.3389/fgene.2014.00170.
- Dissous, C, **Morel, M**, Vanderstraete, M. (2014) Venus kinase receptors: prospects in signaling and biological functions of these invertebrate kinases. *Front Endocrinol*. 5:72. doi: 10.3389/fendo.2014.00072.
- Vanderstraete, M, Gougnard, N, Cailliau, K, **Morel, M**, Hahnel, S, Leutner, S, Beckmann, S, Grevelding, CG, Dissous, C. (2014) Venus kinase receptors control reproduction in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog*. 10(5):e1004138. doi: 10.1371/journal.ppat.1004138.
- Vanderstraete, M, Gougnard, N, Ahier, A, **Morel, M**, Vicogne, J, Dissous, C. (2013) The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. *BMC Genomics* 14:361. doi: 10.1186/1471-2164-14-361.
- Vanderstraete, M, Gougnard, N, Cailliau, K, **Morel, M**, Lancelot, J, Bodart, JF, Dissous, C. (2013) Dual targeting of insulin and venus kinase Receptors of *Schistosoma mansoni* for novel anti-schistosome therapy. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(5):e2226. doi: 10.1371/journal.pntd.0002226.
- Long, T, Vanderstraete, M, Cailliau, K, **Morel, M**, Lescuyer, A., Gougnard, N, Grevelding, C.G, Browaeys, E, Dissous, C. (2012) SmSak, the Second Polo-like Kinase of the Helminth Parasite *Schistosoma mansoni*: Conserved and Unexpected Roles in Meiosis. *PLoS One*. 7(6):e40045. doi: 10.1371/journal.pone.0040045.

INTERNATIONAL COMMUNICATIONS

- Marion Morel, Mathieu Vanderstraete, Steffen Hahnel, Katia Cailliau, Christoph G. Grevelding, Colette Dissous. The *Schistosoma mansoni* protein SmShb interacts with and regulates SmVKR1 signaling. *International Symposium of Flatworm Biology, August 2015, Oxford (UK) and FEBS-EMBO Conference, September 2014, Paris (France)*. Poster.
- Marion Morel, Mathieu Vanderstraete, Nadège Gougnard, Steffen Hahnel, Katia Cailliau, Christoph G. Grevelding, Colette Dissous. The *Schistosoma mansoni* protein SmShb interacts with and regulates SmVKR1 signaling in oocytes. *British Society for Parasitology meeting, April 2013, Bristol, United Kingdom*. Poster.



Colette Dissous, Nadège Gougnard, Marion Morel, Mathieu Vanderstraete, Christian Mitri
Anopheles gambiae Venus Kinase Receptor: structure and functions. *ImmunInv congress, Dijon (France) May 2014. Poster.*

Colette Dissous, Mathieu Vanderstraete, Marion Morel, Nadège Gougnard, Christoph G. Greveling, Katia Cailliau. Inhibition of Insulin and Venus Kinase Receptors by Tyrphostin AG1024 affects reproduction and viability of schistosomes. *Anthelmintics: From Discovery to Resistance, San Francisco, USA, February 2014. Oral Communication.*

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

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

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

REFERENCES

- **Dr Colette Dissous**, PhD
Director of Research, INSERM U1019
Institut Pasteur de Lille
59019 Lille Cedex, France
+33 3 20 87 73 50
colette.dissous@pasteur-lille.fr
- **Dr Jérôme Vicogne**, PhD
Research assistant
Cancer Chemistry & Biology team (CBC) UMR 8161 - CNRS
Institut de Biologie de Lille
59019 Lille Cedex, France
+33 3 20 87 12 49
jerome.vicogne@ibl.fr
- **Dr Katia Cailliau-Maggio**, PhD
Assistant professor
UGSF – UMR8576
Université des Sciences et Technologies de Lille, bâtiment SN3
59650 Villeneuve d'Ascq, France
+33 3 20 43 65 69
katia.maggio@univ-lille.fr

Table des matières

Liste des abréviations	3
Cadre du travail	4
INTRODUCTION	5
I. Schistosome et schistosomiase	5
A. Le schistosome	5
1. Taxonomie	6
2. De l'œuf au parasite adulte : cycle de vie du parasite	8
a. De l'ovogenèse à l'éclosion du miracidium	9
b. Recherche et pénétration de l'hôte intermédiaire	11
c. Le sporocyste : siège de la reproduction asexuée.....	12
d. Recherche et pénétration de l'hôte définitif.....	13
e. Migration et maturation du schistosomule.....	14
f. Les vers adultes : dimorphisme sexuel et reproduction sexuée	15
B. La schistosomiase	18
1. Pathologie.....	18
a. Phase aigüe : syndrome de Katayama.....	18
b. Phase chronique	19
2. Méthodes de diagnostic	20
3. Traitements	21
a. Le Praziquantel (PZQ)	21
b. Molécules alternatives au PZQ.....	23
4. Les méthodes de prévention.....	23
II. Les protéines kinases	26
A. Découverte de la phosphorylation réversible des protéines	26
B. Le domaine kinase	28
C. Classification et évolution	30
D. Les Tyrosines Kinases	34
1. Les CTKs	34
2. Les RTKs	36
a. Mécanismes d'activation.....	37
b. Protéines partenaires des RTKs.....	39

c. Voies de signalisation associées	41
E. Les Kinases comme cibles thérapeutiques	43
III. Les protéines kinases du schistosome : rôle dans la biologie du parasite.....	46
A. Les Ser/Thr kinases de <i>S. mansoni</i>	47
B. Les Tyrosine Kinases de <i>S. mansoni</i>	55
1. Les CTKs de <i>S. mansoni</i>	55
2. Les RTKs de <i>S. mansoni</i>	60
IV. Les Récepteurs Venus Kinase (VKRs)	63
A. Découverte d'un RTK atypique : SmVKR1	63
B. La famille des VKRs.....	65
1. Analyse phylogénétique	65
2. Expression et activité des VKRs	66
C. Les VKRs de <i>S. mansoni</i>	68
1. SmVKR1 et SmVKR2 : deux VKRs distincts.....	68
2. Rôle des SmVKRs dans la reproduction du parasite.....	68
3. Voies de signalisation associées aux SmVKRs	70
V. Projet de thèse	72
RÉSULTATS	73
I. Les RTKs dans la reproduction du schistosome : de nouvelles cibles thérapeutiques.....	73
II. Caractérisation de la kinase Akt/PKB et potentiel en tant que cible thérapeutique	91
III. Rôle de la protéine SmShb dans la signalisation de SmVKR1	123
A. SmShb régule la signalisation de SmVKR1.....	125
B. Etude des partenaires de SmShb.....	159
C. Rôle de JNK dans la reproduction de <i>S. mansoni</i>	164
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	167
BIBLIOGRAPHIE	176

Liste des abréviations

ADP : Adénosine Diphosphate	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique	PCR : Polymerase Chain Reaction
ANF : Atrial Natriuretic Factor	PDK1 : Phosphoinositide-dependent Kinase 1
aPK : atypical Protein Kinase	PG : Progestérone
ATP : Adénosine Triphosphate	PH : Pleckstrin Homology
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy	PIP2 : Phosphatidyl Inositol-4,5-biphosphate
CTK : Cytoplasmic Tyrosine Kinase	PIP3 : Phosphatidyl Inositol-3,4,5-triphosphate
DAG : Diacylglycérol	PK : Proteine Kinase
EGF : Epidermal Growth Factor	PLCγ : Phospholipase C γ
ePK : eukaryotic Protein Kinase	PTB : Phosphotyrosine Binding
ERK : Extracellular signal-regulated Kinase	PZQ : Praziquantel
FGF : Fibroblast Growth Factor	Rho : Ras-homology
GAP : GTPase-Activating Protein	RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
GEF : Guanine Exchange Factor	S/TK : Sérine/Thréonine Kinase
GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique	S6K : Ribosomal S6 Protein Kinase
GPCR : G Protein Coupled Receptor	SER : <i>Schistosoma</i> Epidermal growth factor Receptor
GTP : Guanosine Triphosphate	SH2 : Src-Homology 2
IP3 : Inositol triphosphate	SH3 : Src-Homology 3
IR : Insulin Receptor	Shb : Src-Homology 2-containing adaptor B
JNK : c-jun N-terminal Kinase	TcTex-1 : t-complex associated testis expressed 1
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase	TGF : Transforming Growth Factor
MEK (ou MKK) : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase	TK : Tyrosine Kinase
mGluR : métabotropique Glutamate Receptor	TM : Transmembrane domain
MPF : M-phase Promoting Factor	VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
mTORC : mammalian Target Of Rapamycin Complex	VFT : Venus Fly Trap
NGF : Nerve Growth Factor	VKR : Venus Kinase Receptor

Cadre du travail

Ce travail de recherche a été effectué à l'Institut Pasteur de Lille, au sein du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL) dirigé par le Dr Camille Locht. Il a été réalisé sous la direction du Dr Colette Dissous dans l'équipe « Biologie moléculaire du schistosome : développement et reproduction », dirigée par le Dr Raymond Pierce, puis dans l'équipe « Signalisation moléculaire et contrôle de la croissance et de la différenciation des parasites », dirigée par le Dr Jamal Khalife.

Le CIIL est une structure constituée de 15 équipes de recherches dont 2 équipes ATIP – Avenir. Les recherches effectuées au CIIL sont organisées en 3 axes majeurs : 1) la biologie du pathogène, 2) les stratégies d'infection, 3) les réponses de l'hôte et les processus d'inflammation. Les pathologies ciblées sont variées et incluent des infections causées aussi bien par des virus, des bactéries ou des parasites que des maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme ou la bronchopneumopathie chronique obstructive.

Les recherches de notre groupe dirigé par le Dr C. Dissous concernent l'étude du rôle des protéines kinases dans les mécanismes liés à la reproduction du parasite *Schistosoma mansoni*. Dans ce contexte, les travaux du groupe ont mené en 2003 à la découverte des récepteurs Venus Kinase (VKRs), une famille de récepteurs tyrosine kinases spécifique des organismes invertébrés. Les études ont permis de mettre en évidence un rôle majeur de ces récepteurs dans la reproduction du schistosome. Mon travail de thèse s'est inscrit dans cette thématique et, dans la continuité de mon stage de Master 2 recherche, j'ai entrepris d'identifier les voies de signalisation induites par les VKRs de *S. mansoni* dans le but de définir plus précisément leur rôle dans la biologie du parasite.

L'ensemble de ce travail a été effectué en collaboration avec le Dr Katia Cailliau (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF) – CNRS UMR 8576 – Université de Lille) ainsi qu'avec le Pr Christoph Grevelding (Institut de Parasitologie, Université Justus-Liebig, Giessen, Allemagne). Leurs expertises respectives concernant l'utilisation du modèle d'ovocyte de xénope et la signalisation kinase dans la biologie du schistosome ont été des atouts considérables pour la réussite de ce travail.

Mon travail de thèse a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (36 mois) puis par la Fondation pour la Recherche Médicale FRM N° FDT20150532257 (6 mois).

INTRODUCTION

I. Schistosome et schistosomiase

La schistosomiase (ou bilharziose) représente la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. En 2013, plus de 261 millions de personnes nécessitaient un traitement préventif et plus de 40 millions de personnes ont été traitées contre le parasite (WHO, 2015). La transmission de la schistosomiase est avérée dans 78 pays des régions tropicales et subtropicales, notamment en Afrique où sont localisés 90% des cas [Figure 1].

La schistosomiase est due à des vers parasites, du genre *Schistosoma*, qui se logent au niveau des veines mésentériques de l'hôte où les femelles pondent des centaines d'œufs par jour. Une partie de ces œufs s'enkyste dans les tissus menant ainsi au développement de la pathologie.

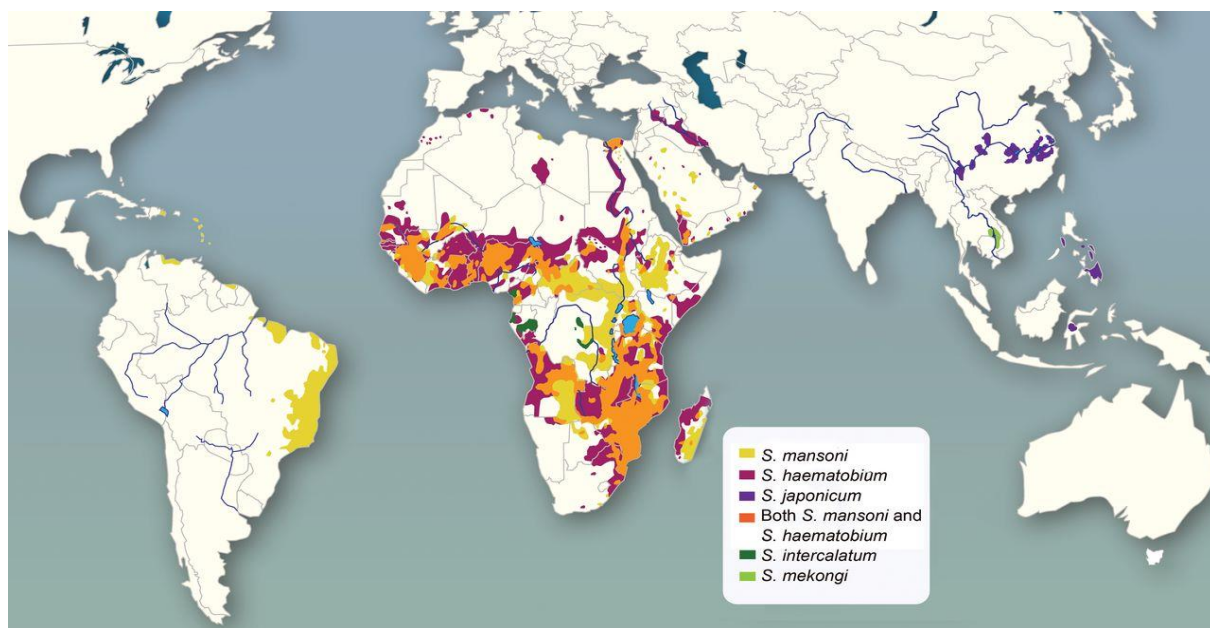


Figure 1 : Répartition géographique des cinq espèces principales de schistosome infestant l'Homme. (Weerakoon et al., 2015)

A. Le schistosome

C'est en 1851, lors d'une autopsie, que Theodor Bilharz [Figure 2A], physicien allemand travaillant à l'hôpital Kasr El Aini (Caire), découvre le ver trématode responsable de l'hématurie. Il le nomme alors *Distomum haematobium*. Dans les années suivantes, du fait de sa différence avec les autres parasites du genre *Distomum*, le nom de *Schistosoma* (du grec *schistos* « séparés » et *sôma*

« corps ») est proposé puis officiellement validé par la commission internationale de nomenclature zoologique en 1889.

T. Bilharz avait noté l'existence d'œufs présentant des éperons latéraux tandis que d'autres possédaient des éperons terminaux. Mais ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que l'hypothèse de la présence de différentes espèces est émise par Sir Patrick Manson [Figure 2B] lorsqu'il décrit des cas de schistosomiasis intestinales où uniquement des œufs à éperons latéraux sont détectés. C'est ainsi qu'en 1907, Louis Westenra Sambon [Figure 2C] décrit l'agent responsable de la schistosomiasis intestinale et le nomme *Schistosoma mansoni*.

Malgré la découverte du parasite relativement récente, la schistosomiasis est une parasitose ancienne. Les papyrus médicaux d'Ebers, datant de 1500 avant J-C, indiquent la présence de vers dans le corps de malades atteints. La présence du schistosome en Egypte à cette époque est confirmée en 1910, lorsque Sir Marc Armand Ruffer [Figure 2D] découvre des œufs calcifiés de *Schistosoma haematobium* dans les tubules rénaux de deux momies égyptiennes datant de 1250 à 1000 avant J-C.

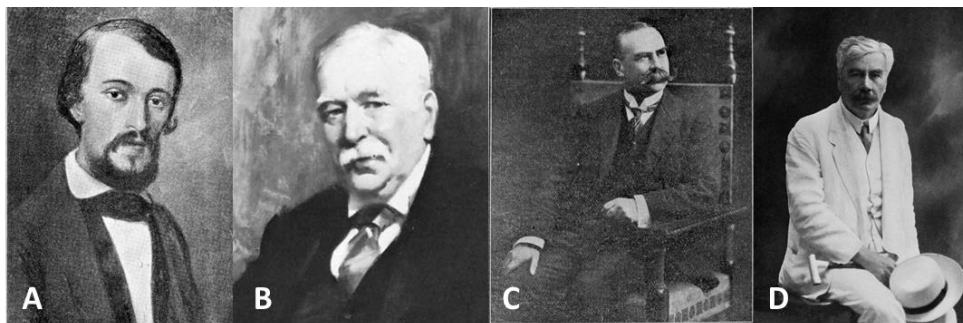


Figure 2 : Personnalités impliquées dans la découverte et l'identification des schistosomes. A. Theodor Maximilian Bilharz (1825-1862), B. Sir Patrick Manson (1844-1922), C. Louis Westenra Sambon (1865-1931), D. Sir Marc Armand Ruffer (1859-1917).

1. Taxonomie

La classification des différentes espèces de schistosomes est la suivante :

Règne	Animalia
Sous-règne	Bilateria
Infra-règne	Protostomia
Super-phylum	Platyzoa
Phylum	Platyhelminthes
Sous-phylum	Neodermata
Classe	Trematoda
Sous-classe	Digenea
Ordre	Strigeatida
Famille	Schistosomatidae

Genre *Schistosoma*

Les schistosomes appartiennent au phylum des Plathelminthes : ce sont des vers plats non segmentés. Les vers adultes présentent un épiderme syncitial, les classant ainsi dans le sous-phylum des Neodermata, et une ventouse orale spécifique de la classe des trématodes. Ce sont des parasites digénétiques, c'est à dire dont le cycle de développement nécessite plusieurs hôtes : un hôte intermédiaire mollusque et un hôte définitif vertébré. Une autre caractéristique principale des schistosomes est qu'il s'agit d'espèces à sexes séparés (Schistosomatidae).

Le genre *Schistosoma* regroupe à ce jour plus de 20 espèces de parasites à travers le monde, infestant les humains mais également d'autres mammifères vertébrés tels que le bétail. Parmi les schistosomes responsables de schistosomiases humaines, on retrouve *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, et, plus rarement, *S. guineensis*. Deux autres espèces, *S. malayensis* et *S. mattheei* ont également été retrouvées chez l'Homme, mais uniquement dans le cas de contaminations accidentelles ou d'infections hybrides. [Figures 1, 3]

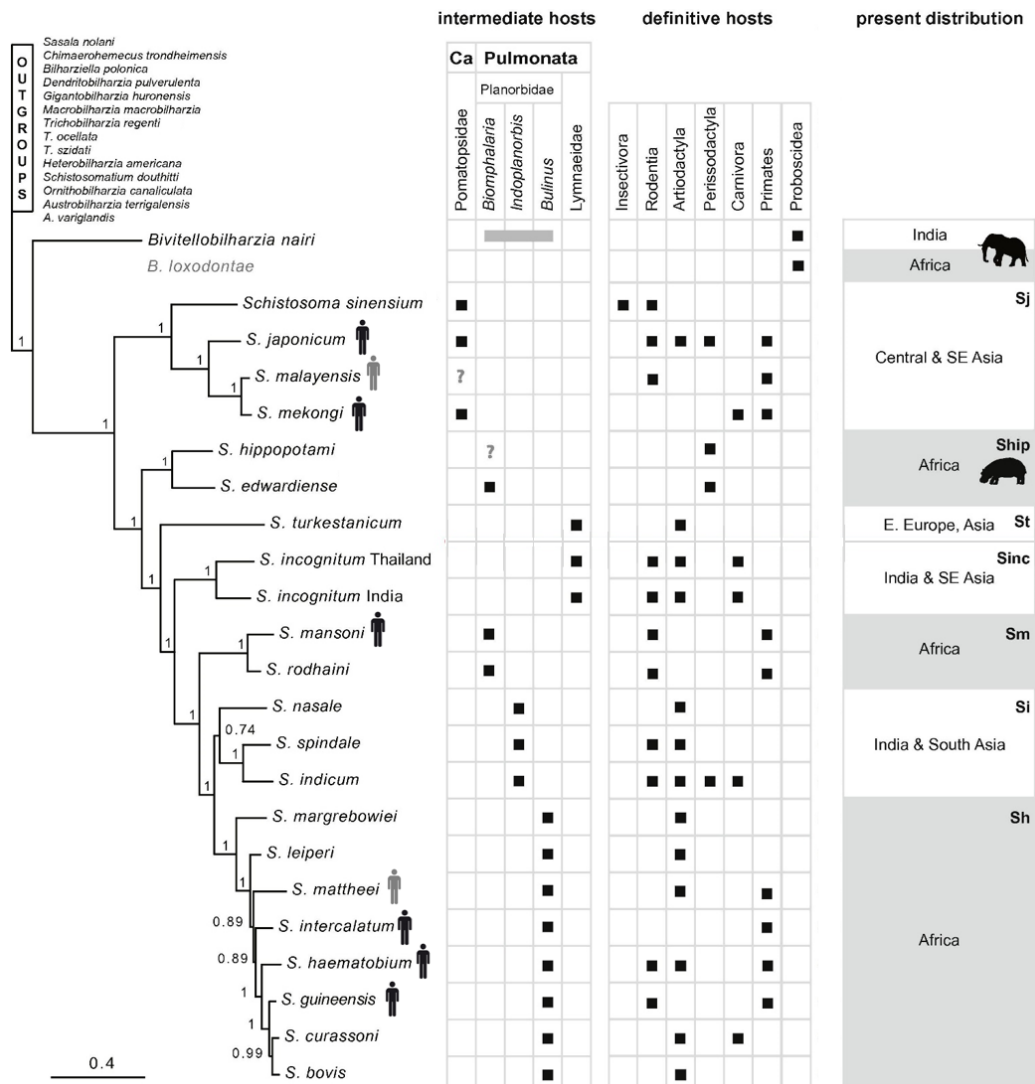


Figure 3 : Phylogénie du genre *Schistosoma* regroupant différentes espèces de schistosomes. Le genre de leur hôte intermédiaire, l'ordre de leur hôte définitif ainsi que leur localisation respective sont indiqués (Webster et Littlewood, 2012).

2. De l'œuf au parasite adulte : cycle de vie du parasite

Comme nous l'avons déjà vu, les schistosomes présentent un cycle de vie complexe nécessitant deux hôtes : un hôte intermédiaire, un mollusque d'eau douce, et un hôte définitif vertébré [Figures 3, 4].

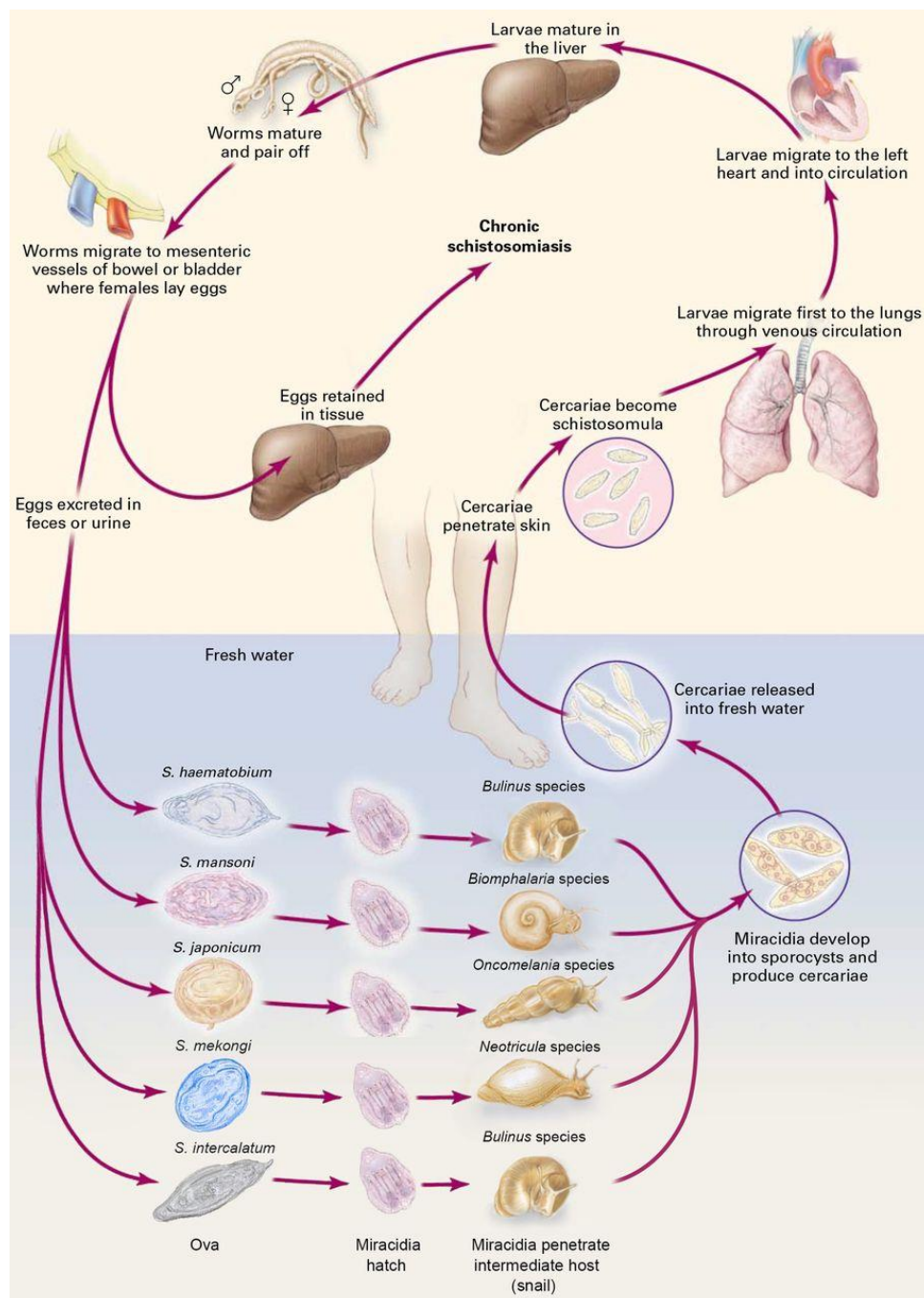


Figure 4 : Cycle de vie du schistosome (Weerakoon et al., 2015).

Brièvement, les œufs provenant de l'hôte vertébré éclosent au contact de l'eau libérant les miracidia. Ces larves ciliées infestent un mollusque permissif puis se différencient en sporocystes. Ceux-ci génèrent des milliers de cercaires qui, une fois libérées dans l'eau, pourront pénétrer l'épiderme de leur hôte vertébré. A ce moment, ils perdent leur queue et se transforment en schistosomules qui rejoignent la circulation sanguine de l'hôte. Après un passage au niveau des poumons, les parasites migrent vers le foie où ils se développent en vers adultes mâles et femelles. Les vers s'apparient, migrent dans les veinules mésentériques intestinales (pour *S. mansoni* et *S. japonicum*) ou dans les veinules du plexus de la vessie (pour *S. haematobium*) et se reproduisent. Chaque femelle peut pondre des centaines d'œufs par jour. Alors qu'une partie de ces œufs s'enkyste dans les tissus et est responsable de la pathologie, le reste est évacué dans l'urine ou dans les selles, selon l'espèce de schistosome, et permet la pérennisation du cycle parasitaire [Figure 4].

a. De l'ovogenèse à l'éclosion du miracidium

Une caractéristique des schistosomes est leur fort taux de fécondité : chaque femelle pond un œuf toutes les 10 min ($\approx 150/\text{jour}$) pour *S. haematobium*, toutes les 5 min ($\approx 300/\text{jour}$) pour *S. mansoni* et toutes les minutes ($\approx 1500/\text{jour}$) pour *S. japonicum*.

Leur taille et leur forme diffèrent selon l'espèce considérée avec une longueur variant de 80 à 150 μm . Les œufs de *S. japonicum* sont petits (70-100 x 50-70 μm) et arrondis, avec un petit éperon latéral. Ceux de *S. haematobium* sont grands (110-170 x 40-70 μm) et ovales avec un éperon terminal. Enfin, les œufs de *S. mansoni* sont grands et ovales (115-175 x 45-70 μm) avec un grand éperon latéral. [Figure 4]

Alors que les œufs se forment dans le ver femelle, le développement embryonnaire se déroule majoritairement une fois l'œuf pondu dans l'organisme de l'hôte.

Dans un premier temps deux stades pré-embryonnaires se succèdent dans le ver femelle : un stade pré-zygotique, correspondant au relargage de l'ovocyte mature et à sa fertilisation lors de son passage dans le réceptacle séminal, puis un stade zygotique (ou stade 0), correspondant au passage du zygote dans l'oviducte où il s'entoure de cellules vitellines (20 pour les œufs de *S. japonicum* (Ho et Yang, 1974), 30 à 40 pour *S. mansoni* (Gönnert, 1955)). Par contractions musculaires de la femelle, le zygote accompagné des cellules vitellines migre dans l'ootype où se forme la coquille.

La coquille est une structure très rigide constituée par réticulation de différentes protéines. Cette réticulation (ou « quinone tanning ») se fait par la formation de ponts quinone dépendante de l'activité Tyrosinase (Fitzpatrick et al., 2007). Un des principaux constituants de la coquille est la protéine p14 : elle représente environ 70% de sa composition et est spécifique de l'œuf. D'autres

protéines, pouvant également être spécifiques de l'œuf (p48) ou être des constituants cellulaires communs (p40, HSP70, actine, tubuline), sont aussi impliquées dans la composition de la coquille (Dewalick et al., 2011).

A leur surface, les œufs présentent des petites épines (« microspines ») qui multiplieraient la surface de l'œuf par 3 (Neill et al., 1988) ainsi que des micropores permettant la prise de nutriments exogènes pendant la migration de l'œuf à travers les tissus de l'hôte [Figure 5A].

A ce stade, aucun clivage n'a encore eu lieu et l'œuf ainsi formé est pondue dans l'environnement extérieur où le développement embryonnaire va se dérouler [Figure 5B].

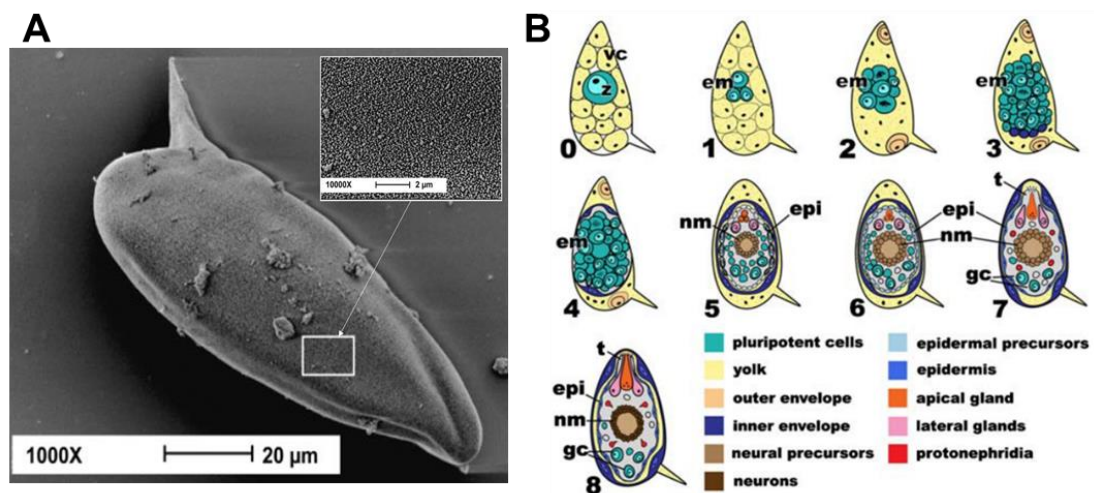


Figure 5 : A. Œuf de *S. mansoni* au microscope électronique à balayage (MEB) (d'après Fitzpatrick *et al.*, 2007); B. Classification des différents stades embryonnaires (Jurberg *et al.*, 2009). Lorsqu'il est pondue par la femelle, le zygote (stade 0) subit ses premiers clivages. Alors que le premier clivage est total et subégal, les suivants sont asynchrones et l'embryon s'oriente selon un axe animal-végétatif (Stade 1). Pendant le stade 2, les cellules vitellines fusionnent, formant un syncytium vitellin et 3 à 4 macromères se détachent des pôles de l'embryon pour adhérer à la coquille : ils donneront l'enveloppe externe. Au stade 3, la masse embryonnaire grandit et commence à se différencier. Lors du stade 4, l'enveloppe interne se différencie alors que l'enveloppe externe régresse. Les stades 5 à 7 correspondent à la différenciation des tissus de l'embryon et au stade 8, la larve mature est complètement formée et est prête à éclore dans des conditions appropriées.

Une partie des œufs pondus restera piégée dans les tissus de l'hôte des mois, voire des années. Ce sont ces œufs qui seront responsables de la pathologie.

L'autre partie des œufs pondus quittera l'hôte en six jours environ et pourra éclore après quelques minutes d'immersion dans l'eau pour donner naissance aux miracidia. La pression osmotique induite par le contact de l'œuf avec l'eau douce est le premier signal permettant cette éclosion (Xu et Dresden, 1990). Cependant d'autres phénomènes moléculaires semblent également impliqués tels que le complexe Ca^{++} /Calmoduline (Katsumata *et al.*, 1989) et l'action d'enzymes hydrolytiques. L'interférence de l'expression de deux Leucine AminoPeptidases SmLAP1 et SmLAP2 ainsi que

l'utilisation d'un inhibiteur d'aminopeptidases entraînent une diminution de l'éclosion (Rinaldi et al., 2009).

b. Recherche et pénétration de l'hôte intermédiaire

Le miracidium est une larve ciliée [Figure 6] d'environ 150-180 μm de long pour 70-80 μm de large qui, une fois hors de sa coquille, nage rapidement (2 mm/s) pour chercher et pénétrer son hôte. Celui-ci est un mollusque d'eau douce dont le genre est spécifique de l'espèce de schistosome considérée : les larves de *S. mansoni* se développeront dans les mollusques du genre *Biomphalaria*, celles de *S. haematobium* et de *S. intercalatum* préféreront le genre *Bulinus*, tandis que celles de *S. japonicum* et de *S. mekongi* se développeront respectivement dans un mollusque du genre *Oncomelania* ou *Neotricula* [Figures 3, 4]. Le phototropisme et le géotropisme des miracidia sont de ce fait dépendants de l'espèce de schistosome. Par exemple, les miracidia de *S. mansoni* présentent un phototropisme positif et un géotropisme négatif, les dirigeant ainsi vers la surface de l'eau où se localise préférentiellement leur hôte permissif *B. glabrata*. Une fois à proximité du mollusque, les organes sensoriels du miracidium détectent différents chimio-attractants permettant à la larve de nager vers son hôte.

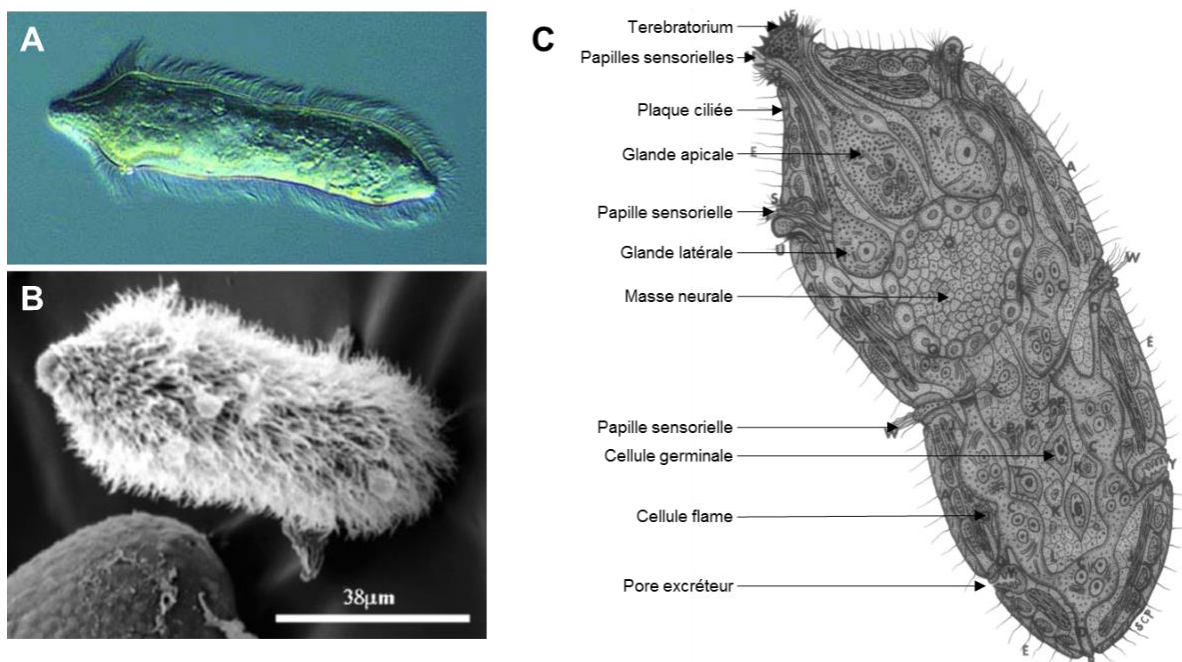


Figure 6 : A. Miracidium nageant dans l'eau. B. Miracidium au microscope électronique à balayage (MEB). C. Morphologie d'un miracidium (d'après Pan, 1980).

Une fois à proximité de son hôte, le miracidium s'attache au niveau du pied ou des tentacules du mollusque par l'intermédiaire du terebratorium (ou papille apicale) puis pénètre en entier à travers

le tégument. Cela entraîne une série de transformations morphologiques, physiologiques et biochimiques importantes. Ainsi, dans les deux heures suivant la pénétration du miracidium, les plaques ciliées se détachent pour laisser place au tégument du sporocyste primaire. De plus, la plupart des organes dégèrent et les cellules germinales prolifèrent donnant ainsi naissance au sporocyste primaire (ou sporocyste mère). Chez *S. mansoni*, seuls 8 miracidia subissent une transformation complète en sporocyste, les autres miracidia pénétrant le mollusque sont pris en charge par le système immunitaire et sont encapsulés.

c. Le sporocyste : siège de la reproduction asexuée

Le sporocyste est la forme de vie essentielle à la propagation du parasite. Un seul sporocyste primaire (ou sporocyste mère) donnera naissance à plusieurs sporocystes secondaires (ou sporocystes filles) qui quitteront le sporocyste mère en traversant son tégument. Les sporocystes filles empruntent ensuite le système circulatoire de l'hôte pour se diriger vers les glandes digestives (ou hépatopancréas) où ils traversent activement le tissu conjonctif pour y poursuivre leur développement. Les sporocystes filles, essentiellement formés de cellules germinales, pourront alors produire d'autres sporocystes filles, ou conduire à la formation d'embryons qui donneront naissance à des cercaires infectieuses [Figure 7].

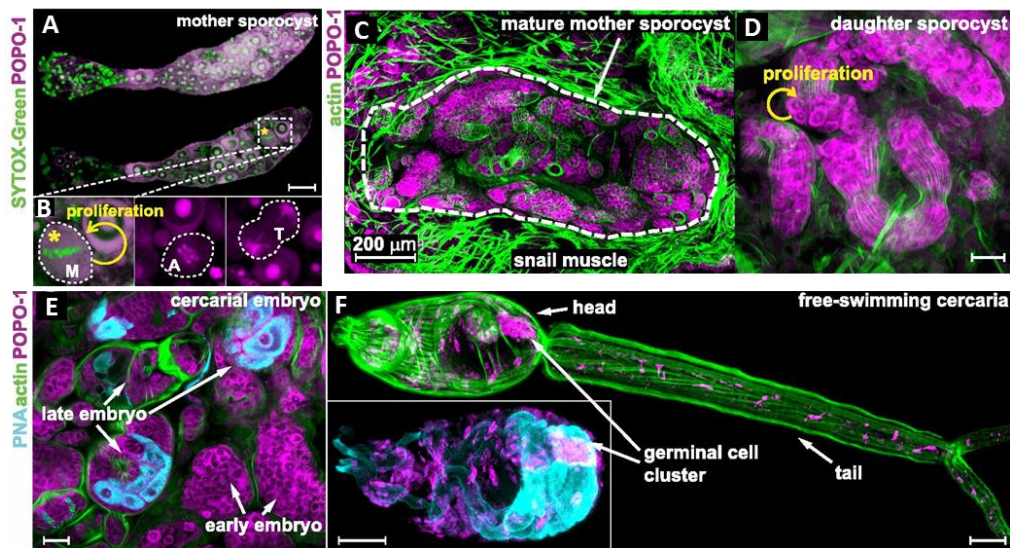


Figure 7 : Détection des cellules germinales chez les sporocystes et chez la cercaire. (A) Sporocyste 24h après transformation *in vitro* marqué avec les marqueurs d'acides nucléiques POPO-1 (marque préférentiellement les ARNs, donc le nucléole et cytoplasme des cellules germinales qui sont très riches en ARN) et SYTOX-Green (marque préférentiellement l'ADN). (B) Cellules germinales en division (M = Métaphase, A = Anaphase, T = Télaphase) chez un sporocyste 24h après transformation. (C) Cryosection d'un tentacule de *B. glabrata* présentant un sporocyste mère avec des sporocystes filles à l'intérieur (3 semaines post-infection). (D, E) Sporocystes filles présents au niveau de l'hépatopancréas du mollusque (6 semaines post-infection) avec (E) la présence d'embryons de cercaires. La PNA (pour Peanut Agglutinine) permet le marquage des glandes

acétabulaires de la cercaire. (F) Une cercaire mature. Echelle: 20 μm , sauf indication contraire. (D'après Wang *et al.*, 2013)

Il est estimé que 3 à 8 semaines après infection d'un mollusque, un seul miracidium peut donner naissance à plusieurs milliers de cercaires. Lorsque les conditions sont réunies (chaleur et forte luminosité), ces cercaires s'échappent du mollusque pour nager vers l'hôte définitif vertébré.

d. Recherche et pénétration de l'hôte définitif

La cercaire (ou furcocercaire) est une larve constituée d'un corps d'environ 125 μm de long associé à une queue bifide d'environ 200 μm lui permettant de se propulser dans l'eau. L'ensemble est recouvert d'un tégument syncytial, lui-même entouré par une couche dense riche en sucre appelée glycocalyx. Celui-ci joue un rôle protecteur contre la faible pression osmotique que la larve subit lors de son passage dans l'eau. Le corps de la cercaire présente 5 paires de glandes acétabulaires ou glandes de pénétration et une glande céphalique [Figures 7, 8]. Ces glandes sécrètent différentes substances qui pourraient être impliquées dans l'adhésion de la cercaire à l'hôte et à sa pénétration.

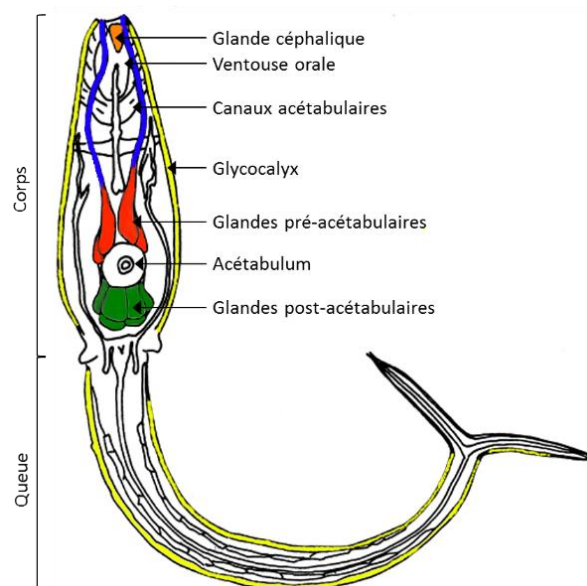


Figure 8 : Schéma annoté d'une cercaire (d'après Dorsey *et al.*, 2002)

Afin de partir à la recherche de son hôte, la cercaire dispose de réserves en glycogène, lui apportant l'énergie nécessaire pour subsister 48 heures maximum.

Dans un premier temps, les cercaires de *S. mansoni* sont dirigées par différents facteurs abiotiques : la température, la gravité et la lumière. Cela leur permet de se concentrer à la surface de l'eau augmentant ainsi la probabilité de rencontre avec leur hôte. Par la suite, lorsqu'un hôte potentiel est assez proche, différents chimio-attractants présents à la surface de la peau (acides gras, L-arginine ou

de petits peptides présentant une L-arginine en position terminale) entrent en jeu (Haeberlein et Haas, 2008). Une fois le contact avec l'hôte établi, les larves s'attachent à la peau *via* la ventouse orale puis pénètrent l'épiderme. La pénétration est active, facilitée par la sécrétion du contenu des glandes acétabulaires de la cercaire : les protéinases produites permettent la lyse d'éléments constitutifs de l'épiderme et du derme.

La pénétration est accompagnée de la perte de la queue et du glycocalyx, de la formation d'un tégument heptalaminé (double membrane) et du passage d'une respiration aérobie à un métabolisme anaérobie. L'ensemble de ces modifications participe à la conversion du corps de la cercaire en schistosomule qui durera environ 3 h.

e. Migration et maturation du schistosomule

Le schistosomule [Figures 9A, B] traverse l'épiderme afin de rejoindre les capillaires dermiques et être emporté dans la circulation sanguine.

En environ 6 jours pour *S. mansoni*, le schistosomule atteint les poumons où une première phase de maturation a lieu : son corps s'allonge tout en gardant un volume constant [Figure 9C]. Le schistosomule va également exercer des mouvements rapides de contractions et d'extensions lui permettant de rejoindre la circulation systémique et d'atteindre la veine porte du foie où a lieu la seconde phase de maturation [Figure 9D]. Le schistosomule commence à se nourrir de sang et sa croissance débute. Après environ 21 jours dans son hôte vertébré, les organes sexuels du parasite se développent pour devenir des vers adultes en 1 semaine environ. Les parasites vont ainsi s'apparier entre 28 et 35 jours après la pénétration de la cercaire (Wilson, 1987) et migrer vers leur site de ponte.

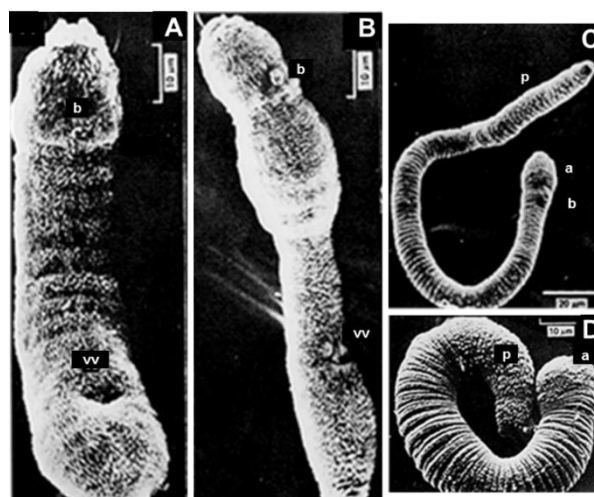


Figure 9 : Développement du schistosomule de *S. mansoni* (MEB). A. Schistosomule « peau » d'1 jour, vue ventrale. B. Schistosomule « peau » de 2 jours, vue ventro-latérale. C. Schistosomule « poumon » de 7 jours. D. Schistosomule « foie » de 8 jours. (b : bouche ; vv : ventouse ventrale ; a : antérieur ; p : postérieur). (D'après Crabtree et Wilson, 1980).

f. Les vers adultes : dimorphisme sexuel et reproduction sexuée

Le sexe des schistosomes est génétiquement déterminé par les chromosomes sexuels. Les mâles sont homozygotes ZZ tandis que les femelles sont hétérozygotes ZW dès la formation du zygote. Mais ce n'est qu'au cours du développement des schistosomules en vers adultes que le dimorphisme sexuel apparaît phénotypiquement. La femelle possède un corps long et fin ($\approx 15 \times 0,2$ mm) tandis que celui du mâle est plus trapu ($\approx 10 \times 0,5$ mm) et forme une gouttière, le canal gynécophore dans lequel la femelle se loge. Ce canal est tapissé d'épines dirigées irrégulièrement permettant certainement de maintenir la femelle dans le canal. Chez *S. mansoni*, le tégument du mâle présente de nombreux tubercules à sa surface alors que celui de la femelle est beaucoup plus simple et uniforme. On note également la présence de pores dans le tégument des vers favorisant sûrement les échanges avec l'autre sexe et avec l'hôte. Les deux sexes présentent des ventouses mais celles du mâle sont plus marquées et plus musclées lui permettant d'adhérer à la paroi des vaisseaux sanguins de l'hôte [Figure 10].

Une fois mature, le mâle est attiré par la femelle. Ils s'apparient et migrent vers leur lieu de ponte. Les vers de *S. mansoni* et *S. japonicum* ont un tropisme pour les veines mésentériques, avec une préférence pour les branches postérieures des veines mésentériques supérieures et inférieures pour *S. mansoni* tandis que *S. japonicum* se dirige vers les branches antérieures des veines mésentériques supérieures. *S. haematobium*, quant à lui, est retrouvé dans le plexus vésical (Faust et al., 1934).

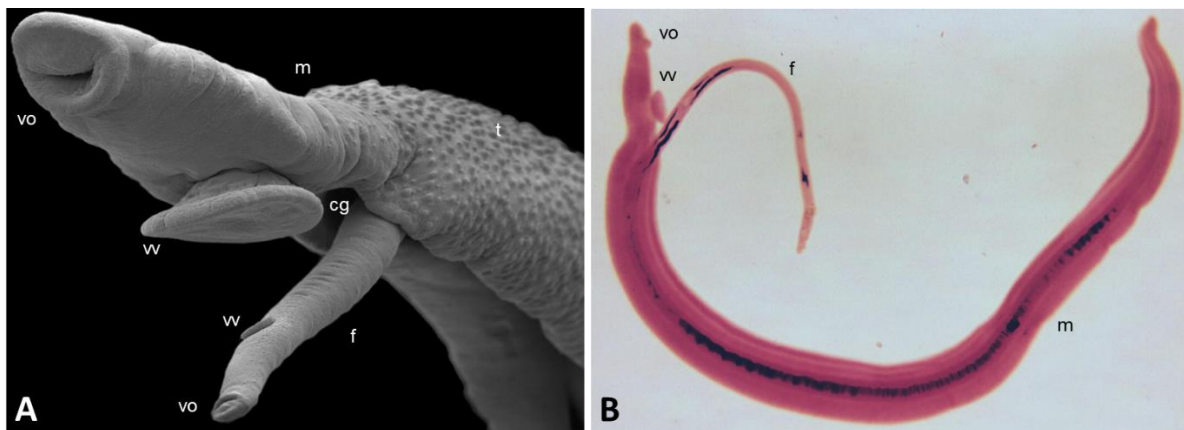


Figure 10 : Couples de vers adultes *S. mansoni*. A. Vue au microscope électronique à balayage (Crédits : Jim Collins, Ana Viera et Phillip Newmark). B. Vue au stéréomicroscope. (m : mâle ; f : femelle ; cg : canal gynécophore ; t : tubercule ; vv : ventouse ventrale ; vo : ventouse orale.)

Le système reproducteur du mâle est constitué de 4 à 8 lobes testiculaires situés dorsalement où se déroule la spermatogenèse. A la périphérie des lobes, les cellules germinales se développent en spermatogonies. Les divisions se succèdent pour donner des spermatozoïdes puis des spermatozoïdes

matures qui vont être collectés dans la partie ventrale des testicules. Les spermatozoïdes sont ensuite déversés dans la vésicule séminale *via* le *vas deferens*. Là, ils seront émis dans le canal gynécophore en empruntant le canal éjaculateur puis le cirrus [Figure 11]. A noter que les spermatozoïdes produits par les schistosomes possèdent un seul flagelle contrairement à ceux produits par la majorité des plathelminthes qui sont biflagellés.

Le système reproducteur de la femelle est plus complexe. Il occupe jusqu'aux deux tiers du corps du parasite et est constitué d'un ovaire unique et d'un vitellarium [Figure 11].

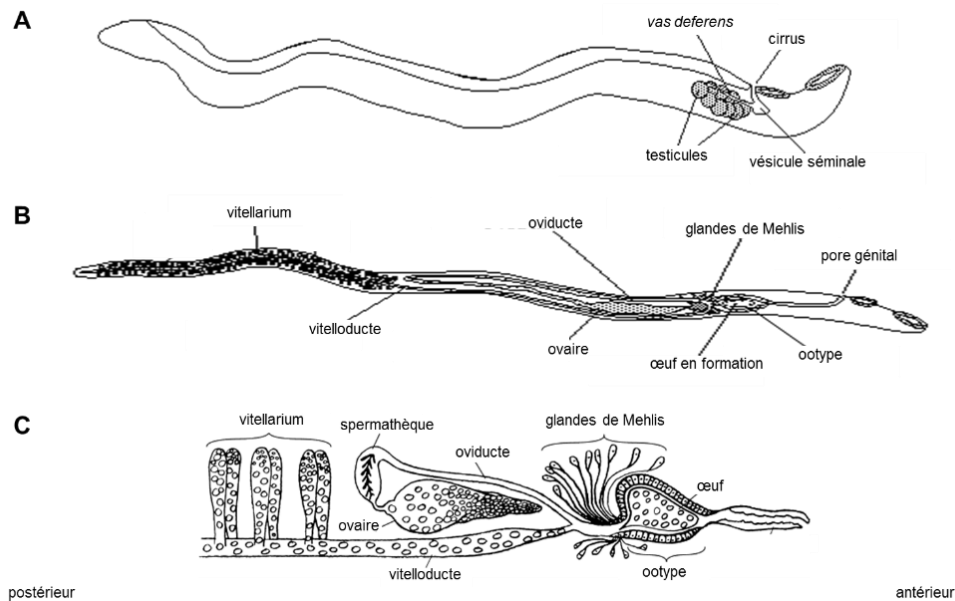


Figure 11: Schéma de l'appareil reproducteur de vers adultes de *S. mansoni*. A. Ver mâle. B. Ver femelle. (Schémas d'après Dr T. Stewart). C. Schéma de l'appareil reproducteur d'un ver femelle de *S. mansoni* (D'après deWalick *et al.*, 2012).

L'ovogenèse se déroule au sein de l'ovaire. Les petits ovocytes immatures, ou oogonies, sont bien rangés, serrés dans la partie antérieure de l'ovaire [Figures 11, 12]. La maturation des ovocytes est linéaire et les gros ovocytes matures sont retrouvés dans la partie postérieure de l'ovaire, prêts à migrer dans l'oviducte. Chez *S. mansoni*, le passage d'un ovocyte immature à un ovocyte mature nécessite 7 jours (Nollen, 1983). Le vitellarium s'étend de l'ovaire à l'extrémité postérieure de la femelle. Il est constitué de plusieurs follicules vitellins remplis de cellules vitellines. Celles-ci sont riches en gouttelettes lipidiques et en vésicules de sécrétion. Elles jouent un rôle dans la formation de l'œuf et dans la nutrition de l'embryon au cours de son développement. Une fois matures, les cellules vitellines migrent dans le vitello-ducte. Celui-ci traverse longitudinalement le corps de la femelle et rejoint l'oviducte donnant naissance au vitello-oviducte.

Les ovocytes matures rejoignent l'oviducte, où ils traversent la spermathèque, zone dilatée de l'oviducte où sont stockés les spermatozoïdes. L'ensemble ovocyte + spermatozoïde traverse le vitello-

oviducte et s'entoure de cellules vitellines pour arriver dans l'ootype. Là, l'œuf est assemblé avec l'aide de l'épithélium cubique tapissant l'ootype et des glandes de Mehlis. Le rôle de ces glandes est encore incertain mais elles pourraient être impliquées dans la formation de la coquille de l'œuf. (Biolchini et al., 2006; Collins et al., 2011; Neves et al., 2005)

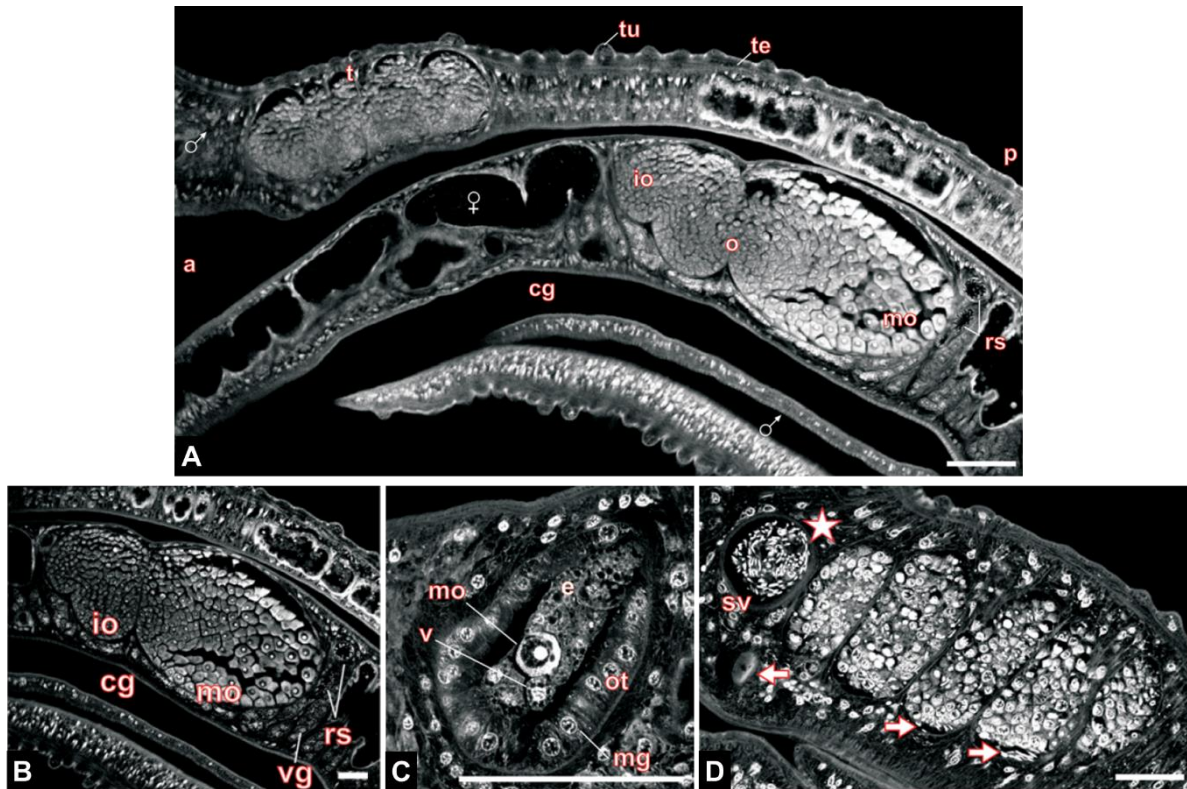


Figure 12 : Couples de vers adultes *S. mansoni* au microscope confocal à balayage laser. A. Vue d'ensemble. B. Ovaire contenant des ovocytes matures et des ovocytes immatures. C. Ootype contenant un œuf. D. Lobes testiculaires et vésicule séminale. (Abréviations : a : antérieur ; p : postérieur ; t : testicules ; tu : tubercule ; te : tégument ; o : ovaire ; io : ovocytes immatures ; mo : ovocytes matures ; rs : réceptacle séminale ; cg : canal gynécophore ; vg : glande vitelline ; v : cellule vitelline ; ot : ootype ; e : œuf ; mg : glande de Mehlis ; sv : vésicule séminale. Echelle : 60 μ m. D'après Beckmann *et al.*, 2010b)

L'appariement entre le mâle et la femelle est essentiel pour compléter le développement des organes reproducteurs de la femelle et pour la formation d'œufs viables. Le mécanisme régissant cette maturation n'est pas connu à ce jour. En 1984, Popiel et Basch ont montré que la vitellogenèse peut être induite localement par la présence d'un segment de ver mâle (Popiel et Basch, 1984). Le contact entre les deux partenaires semble donc important et une (des) substance(s) (hormone, peptide, nutriments) provenant du mâle pourrai(en)t être impliquée(s). Il a également été montré que ce phénomène est réversible : lorsque le couple est séparé, les organes reproducteurs de la femelle régressent en 3 à 5 jours. L'appariement doit donc être permanent pour maintenir l'état mature de la

femelle. Une autre particularité des schistosomes est leur monogamie. En effet, lorsqu'un couple est séparé, les vers ont toujours tendance à s'apparier avec leur partenaire d'origine.

Alors qu'une grande majorité des plathelminthes sont des espèces hermaphrodites, les schistosomes sont gonochoriques. Une hypothèse à cette séparation des sexes serait la nécessité d'un corps à la fois musclé et fin. Ainsi, la musculature du mâle permet au couple de résister au flux sanguin de l'hôte tandis que le corps effilé de la femelle lui permet de s'insinuer dans les veinules afin de déposer les œufs à proximité de la lumière intestinale ou vésicale (Loker et Brant, 2006). Mais le déroulement de la ponte n'est que peu connu à ce jour. Certaines études montrant la présence de femelles seules proches de la lumière intestinale sont en faveur de cette hypothèse, mais d'autres études montrent une majorité de couples à cet endroit. Il se pourrait alors que la femelle reste en partie dans le canal gynécophore tout en s'étirant au plus loin pour pondre dans les capillaires au plus proches de la lumière intestinale.

Un grand nombre des œufs ainsi pondus traversent la paroi et sont évacués par l'hôte dans le milieu extérieur afin de pérenniser le cycle parasitaire ; une autre partie est emportée par le flux sanguin et va s'enkyster dans les tissus de l'hôte à l'origine de la pathologie chronique.

B. La schistosomiase

1. Pathologie

En fonction de l'espèce de schistosome infestant et de la sévérité de l'infection, les symptômes peuvent être différents. On peut décrire l'évolution de la pathologie en 2 phases distinctes : la phase aiguë et la phase chronique.

Suite à l'infestation, il peut parfois y avoir apparition d'une éruption cutanée, ou rash, au niveau des sites de pénétration des cercaires [Figure 13]. Cette réaction apparaît généralement dans les heures suivant l'infection et est semblable, bien que moins sévère, à celle observée dans les cas de dermatites des nageurs où l'éruption cutanée est due à la réaction immunitaire suite à la pénétration de cercaires d'espèces de schistosomes incapables de se développer chez l'Homme.

a. Phase aiguë : syndrome de Katayama

La schistosomiase aiguë est le résultat de la réponse immunitaire dépendante de la migration des schistosomules, de leur maturation en vers adultes et des premières pontes. Dans la plupart des cas, cette phase est asymptomatique, notamment pour les personnes vivant dans les aires endémiques.

Lorsqu'ils se manifestent, les symptômes apparaissent entre 14 et 84 jours après la première exposition au parasite. Il peut s'agir de fièvre, de fatigue, de myalgie, de maux de tête, d'urticaire, d'une toux non productive, de douleurs abdominales, d'une éosinophilie,...

Ces symptômes n'étant pas spécifiques, le diagnostic de la schistosomiase est compliqué à ce stade.

b. Phase chronique

Les schistosomiasés sont dans tous les cas associées à une réponse inflammatoire chronique due à l'emprisonnement des œufs dans les tissus par la formation de granulomes que l'on qualifie de bilharziens [Figure 13].

La formation d'un granulome est une réaction immunitaire en réponse à la présence d'un corps étranger à l'intérieur de l'organisme. Les œufs présents dans les tissus présentent des antigènes qui activent les lymphocytes T CD4+. Une réponse de type Th2 se met en place et des polynucléaires éosinophiles et des macrophages de type M2 sont recrutés. L'ensemble de ces cellules immunitaires réunies autour de l'œuf et encerclées par des fibroblastes constitue le granulome bilharzien. Celui-ci est essentiel pour minimiser les dommages infligés par les œufs aux tissus de l'hôte. Des études ont montré que lorsque des souris immunodéprimées sont infestées par *S. mansoni*, l'absence de réactions induisant la formation de granulome conduit à une très forte mortalité par rapport aux souris contrôles (Hams et al., 2013).

S. mansoni et *S. japonicum* sont responsables de la forme intestinale de la maladie. Les œufs pondus s'enkystent principalement dans le foie et dans la paroi intestinale. Cela entraîne la formation de granulomes qui pourront conduire à une hyperplasie de la muqueuse intestinale ou à la formation d'ulcères et d'abcès. Les réactions inflammatoires au niveau du foie induisent généralement une hépatomégalie, parfois associée à une hypertension portale, une fibrose hépatique ou une splénomégalie [Figure 13]. L'ensemble de ces réactions peut se manifester cliniquement par des douleurs abdominales, des diarrhées ou la présence de sang dans les selles.

S. haematobium est responsable de la schistosomiase urinaire. Les œufs sont enkystés dans la paroi de la vessie, menant à des lésions de la muqueuse. Le premier symptôme visible est l'hématurie. Elle apparaît après 10 à 12 semaines d'infection et perdure. A long terme, les réactions inflammatoires peuvent induire une calcification de la vessie ou la fibrose du tractus urinaire. L'inflammation constante est également la source de surinfections bactériennes.

Du fait de son tropisme dans la sphère urogénitale, *S. haematobium* peut également affecter la prostate ou le tractus génital féminin entier chez environ 1/3 des femmes infectées. Dans ce dernier cas, l'infection entraîne des douleurs, des saignements et parfois même l'infertilité. L'atteinte de

l'appareil génital augmente également le risque d'infection par des maladies sexuellement transmissibles telles que le VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine) (Kjetland et al., 2012).

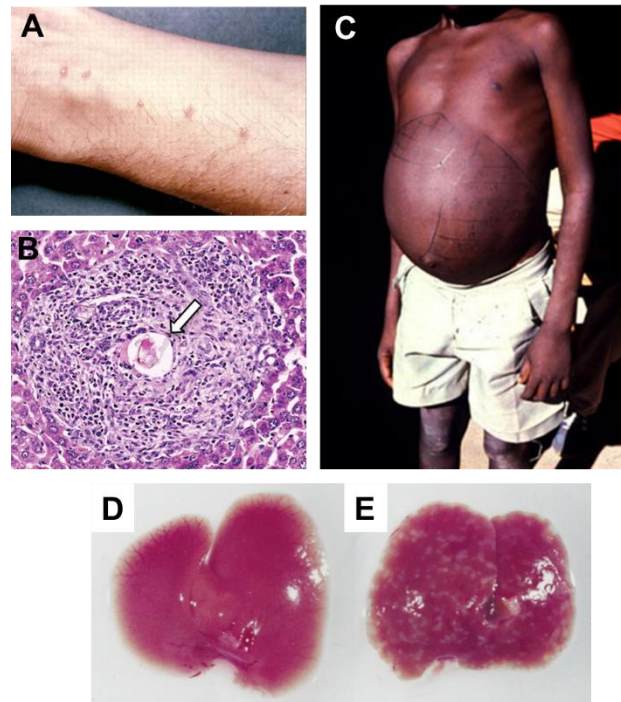


Figure 13 : Exemple de symptômes observables lors d'une infection par *S. mansoni*. A. Rash observé suite à la pénétration des cercaires à travers l'épiderme. B. Coupe histologique de foie présentant un granulome bilharzien. L'œuf, au centre, est indiqué par la flèche. C. Individu atteint d'une hépatosplénomégalie sévère. D. Foie de souris saine. E. Foie de souris infectée. (D'après Gray *et al.*, 2011; Hams *et al.*, 2013).

Des cas de neuroschistosomiase sont parfois recensés, ils correspondent à la présence d'œufs dans le système nerveux central de l'hôte. En entraînant la formation de lésions ressemblant à des tumeurs, *S. japonicum* est responsable des formes cérébrales. Celles-ci sont à l'origine d'une augmentation de la pression intracrânienne causant quasi-systématiquement des maux de tête. Elles peuvent également provoquer des déficits moteurs ou de la vision, des crises ou une défaillance mentale. D'autres symptômes peuvent être observés tels que des troubles de la sensibilité, une ataxie ou des troubles de la parole. *S. mansoni* est quant à lui principalement la cause de schistosomiasis de la moelle épinière. Elles se manifestent par des douleurs dans le bas du dos, souvent suivies d'une faiblesse des membres inférieurs, une dysfonction urinaire, une constipation ou une impuissance sexuelle (Ferrari et Moreira, 2011).

2. Méthodes de diagnostic

Dans la plupart des cas, le diagnostic est direct, basé sur la détection d'œufs dans des échantillons de selles ou d'urine. Cependant, la ponte ne débutant qu'entre 1 et 3 mois après le début

de l'infection, ces méthodes de diagnostic ne sont pas applicables pendant la phase aiguë de la maladie. La technique de Kato-Katz, décrite en 1970, consiste en la quantification du nombre d'œufs présents dans un échantillon de selle par observation microscopique. Du fait de sa simplicité et de son faible coût, il s'agit de la méthode standard recommandée par l'OMS et est de ce fait beaucoup utilisée dans les zones endémiques pour *S. mansoni* et *S. japonicum*. En ce qui concerne la détection des infections par *S. haematobium*, la technique la plus utilisée est la concentration des œufs présents dans les urines par filtration suivie de l'examen microscopique. Cependant, la sensibilité de ces techniques n'est pas suffisante pour détecter les infections de faible intensité. D'autres techniques directes ont été mises en œuvre, permettant d'augmenter la sensibilité de la détection mais nécessitant des moyens plus coûteux et difficiles à mettre en place pour un diagnostic à grande échelle.

Le diagnostic peut également être immunologique, basé sur la présence dans le sérum d'anticorps dirigés contre les protéines du parasite ou d'antigènes de schistosome circulant dans le sang, l'urine ou la salive. Ces méthodes permettent de détecter l'infection lorsque celle-ci est faible, mais, du fait de la persistance des antigènes après traitement, elles ne permettent pas toujours de discriminer les patients infectés de ceux récemment guéris. Cependant, elles permettent de déterminer l'intensité de l'infection et sont donc très utiles pour le suivi de la pathologie par les programmes de contrôle.

Plus récemment, des méthodes basées sur la détection d'acides nucléiques ont été mises au point. Elles permettent de détecter par PCR, l'ADN ou l'ARN de schistosome dans les selles, les urines ou les biopsies d'organes affectés. De la même façon, de l'ADN libre de parasite, provenant de schistosomules morts, du renouvellement du tégument des adultes ou de la désintégration d'œufs morts, peut être détecté dans le sang, l'urine, la salive ou le liquide céphalo-rachidien. Ces méthodes sont sensibles et peuvent permettre d'identifier l'espèce de schistosome responsable de l'infestation. Mais les coûts engendrés sont élevés et des composés présents dans l'échantillon peuvent inhiber la PCR (Weerakoon et al., 2015).

3. Traitements

a. Le Praziquantel (PZQ)

Le Praziquantel (PZQ) est la molécule la plus utilisée pour lutter contre la schistosomiase aujourd'hui. Il permet un taux de guérison de 60 à 90%. Sa découverte est due à la collaboration des groupes pharmaceutiques Merck et Bayer dans les années 1970. Initialement, Merck générait des dérivés de pyrazino-isoquinoline afin d'identifier un nouveau tranquillisant avec peu d'effets secondaires. Les doses nécessaires pour leur but premier étant trop importantes, les composés ont

été cédés à Bayer. Ainsi, en 1972, lors d'un criblage d'environ 400 composés, le PZQ s'est révélé être la molécule anti-helminthique la plus efficace (Andrews et al., 1983). Suite à des résultats prometteurs chez l'animal, les essais thérapeutiques chez l'Homme ont débuté en 1978.

Commercialisé par Bayer sous le nom Biltricide®, le PZQ est efficace contre toutes les espèces de schistosome. La dose standard recommandée est de 40 mg/Kg lors d'infections par *S. mansoni* ou *S. haematobium* et de 60 mg/Kg pour *S. japonicum*. Bien que son mode d'action ne soit pas clairement établi, il semble que la molécule entraînerait un influx massif de calcium extracellulaire, perturbant ainsi l'homéostasie calcique du parasite. *In fine*, le PZQ provoque une paralysie des vers qui se détachent alors de la paroi endothéliale, des vacuoles et des bourgeons apparaissent en surface des vers qui sont ainsi progressivement lysés. Le PZQ permettant d'exposer certains antigènes à la surface du ver, son efficacité est dépendante de la réponse immunitaire de l'hôte (Brindley et Sher, 1987; Doenhoff et al., 1987). Les effets secondaires (douleurs abdominales, maux de tête, vertiges, présence de sang dans les selles) apparaissent 2 à 4 heures après la prise du médicament. Ils sont généralement bien tolérés et leur intensité est proportionnelle au taux d'infection du patient.



Figure 14 : Le praziquantel. A. Formule chimique du PZQ (2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]isoquinoline-4-one). B. Commercialisation par Bayer sous le nom de Biltricide® en comprimés de 600 mg.

Son utilisation massive est également due à son coût très faible : un comprimé coûte au maximum 0,08 US\$, amenant le prix moyen du traitement de 0,15 US\$ pour un enfant à 0,30 US\$ pour un adulte.

Cependant, le PZQ est commercialisé sous la forme d'un mélange racémique (comprenant 50% de formes lévogyres et 50% de formes dextrogyres). Or, seul l'énantiomère lévogyre possède une activité contre le parasite. Ainsi, l'énantioséparation (Liu et al., 2004) ou la synthèse énantiosélective (Roszkowski et al., 2006), même si elle induirait certainement un coût de production plus élevé, pourrait permettre de réduire les doses de traitement et donc les effets secondaires, ou par ailleurs d'administrer des doses plus importantes sans modifier la toxicité du traitement.

Une limite majeure du PZQ est son manque d'efficacité contre les parasites juvéniles. Alors que les schistosomules jeunes sont susceptibles à la molécule, les parasites de 3 à 4 semaines sont résistants avant de devenir à nouveau complètement sensibles vers 6 à 7 semaines (Sabah et al., 1986). Des études réalisées chez la souris ont montré qu'une dose de PZQ 30 fois supérieure à celle requise pour tuer des vers de 7 semaines est nécessaire pour éliminer seulement 50% des parasites de 4 semaines (Pica-Mattocchia et Cioli, 2004).

Du fait de son utilisation massive, l'apparition de parasites résistants au PZQ est à craindre. D'ailleurs, des souches qui semblent être tolérantes ont déjà été décrites, notamment au Sénégal et en Egypte. Au nord du Sénégal, l'utilisation du PZQ induit un taux de guérison de 18-36% (Stelma et al., 1995), bien inférieur au taux habituel de 60 à 90%.

b. Molécules alternatives au PZQ

D'autres molécules sont efficaces pour lutter contre le schistosome parmi lesquelles l'oxamniquine ou des dérivés de l'artémisinine.

L'oxamniquine est une tétrahydroquinoléine qui agit uniquement contre *S. mansoni*. Son coût étant plus élevé que le PZQ, elle n'est utilisée que dans quelques pays d'Amérique du sud ainsi que dans les zones où les vers présentent une tolérance au PZQ.

Les dérivés de l'artémisinine, tels que l'artéméther et l'artésunate, développés comme drogues antipaludéennes, sont actifs contre les différentes espèces de schistosomes. Dans les zones d'endémie, il a été montré que leur association avec le PZQ permettait d'augmenter le taux de guérison. Cependant, la menace du développement de résistances de *Plasmodium*, l'agent du paludisme, aux dérivés de l'artémisinine empêche l'utilisation de ces traitements, notamment dans les zones de co-endémie.

4. Les méthodes de prévention

En plus des efforts de l'OMS pour permettre aux populations des zones endémiques d'être traitées régulièrement, différents programmes nationaux et internationaux de lutte contre la schistosomiase ont été mis en place. C'est le cas de la SCI (Schistosomiasis Control Initiative), créée et financée par la fondation Bill et Melinda Gates en 2002 dont la mission est de permettre aux populations les plus pauvres d'accéder aux traitements. Elle assiste ainsi l'OMS pour distribuer les 250 millions de comprimés de PZQ donnés par an par la firme Merck depuis 2012. La chimioprévention a ainsi permis de réduire significativement la prévalence de la maladie dans certains pays émergents tels que la Chine, le Brésil ou l'Egypte.

La prévention passe également par l'éducation des populations. Mais cela reste compliqué puisqu'une modification de leur comportement nécessite une amélioration de leurs conditions sanitaires. L'accès à une eau dépourvue de schistosomes pour la lessive ou la baignade est possible mais nécessite un fort investissement. C'est ainsi que les pays les plus aisés, comme le Japon ou Porto-Rico, ont pu éradiquer la schistosomiase au cours de leur histoire.

Du fait de la nécessité de l'hôte intermédiaire dans la transmission du parasite, des stratégies de contrôle des populations de mollusques ont également été mises en place très tôt. Le niclosamide est particulièrement utilisé comme mollusquicide chimique en raison de sa faible toxicité pour l'Homme et le bétail. Mais du fait de son coût et pour limiter son impact sur l'environnement, son utilisation doit être étudiée et ciblée.

Des alternatives plus naturelles sont aujourd'hui envisagées, comme l'utilisation de plantes mollusquicides, l'introduction de souches de mollusques résistantes à l'infection par le parasite, ou l'introduction de prédateurs des mollusques. C'est le cas du « projet crevette » dont le but est de réintroduire l'espèce *Macrobrachium vollenhovenii* dont l'écosystème a été bouleversé par la construction du barrage Diama au Sénégal en 1986. Ces prédateurs naturels des mollusques ne pouvant plus accéder à l'océan pour se reproduire, cela a entraîné une forte augmentation de la prévalence de la schistosomiase dans les villages bordant le fleuve. La réintroduction durable de *M. vollenhovenii* pourrait donc non seulement permettre de réduire la prévalence de la maladie mais également contribuer à l'économie locale autour de la pêche de la crevette (www.projet-crevette.org ; Savaya Alkalay *et al.*, 2014; Sokolow *et al.*, 2015).

Une autre méthode de prévention intéressante serait l'établissement d'un vaccin efficace qui préviendrait l'infestation ou qui diminuerait considérablement le taux de reproduction du parasite. Bien que non applicable à l'Homme pour raison éthique, le développement d'un vaccin à partir de cercaires irradiées a démontré la possibilité d'une vaccination pouvant prévenir la ré-infestation chez l'animal et a permis d'acquérir une certaine connaissance des réponses immunitaires induites suite à l'infection. Depuis des dizaines d'années, plus d'une centaine d'antigènes de schistosomes ont été identifiés. Certains ont induit une bonne protection chez les modèles animaux et 6 sont entrés en phase pré-clinique dans les années 1990.

Parmi ces antigènes, la Glutathione S-transférase 28 KDa de *S. haematobium* (Sh28GST) a été identifiée et caractérisée par les équipes du Pr André Capron à l'Institut Pasteur de Lille (Balloul *et al.*, 1987). L'immunisation par la protéine recombinante a montré un effet protecteur contre la réinfestation mais réduit surtout la fécondité des parasites et la viabilité des œufs (Boulanger *et al.*, 1999). Les essais cliniques du candidat vaccin, nommé Bilhvax, ont débuté en 1998. Suite aux résultats satisfaisants

obtenus lors des phases I et II, le vaccin est actuellement en phase III d'essai clinique. Il s'agit ainsi du candidat vaccin le plus avancé à ce jour.

D'autres candidats vaccins sont également à l'étude. C'est le cas de SmTSP-2, une Tétraspamine exprimée dans la membrane externe du tégument du parasite adulte. La vaccination de souris par SmTSP-2 recombinante réduit de 57% le nombre de vers et de 64% le nombre d'œufs piégés dans le foie. Fait intéressant, la protéine recombinante est reconnue par les IgG1 et IgG3 des individus naturellement résistants à l'infection par *S. mansoni*, mais pas par les IgG des patients infectés chroniquement (Tran et al., 2006). La phase I d'essai clinique a débuté en 2014 aux Etats-Unis (OMS, 2014).

C'est également le cas de Sm14, une Fatty-Acid Binding Protein (FABP) nécessaire pour l'assimilation des lipides de l'hôte par le parasite et dont l'effet est immunogène vis-à-vis de *S. mansoni*, mais également de la grande douve du foie *Fasciola hepatica* (Tendler et Simpson, 2008). Les résultats de la phase I de l'essai clinique viennent d'être publiés (Santini-Oliveira et al., 2015) et sont très encourageants pour la poursuite en phase II.

Enfin, un dernier antigène intéressant est Sm-p80, une calpaïne impliquée dans le renouvellement du tégument du parasite et donc dans son échappement à la réponse immunitaire (Siddiqui et al., 1993). Des tests sur la souris ont mis en évidence un effet thérapeutique avec une réduction de 53% de la charge parasitaire et une diminution de 29% d'œufs pondus (Siddiqui et al., 2008). Des tests pré-cliniques réalisés sur des babouins laissent également supposer un bon effet prophylactique (52-58% d'efficacité) et sont encourageants pour la poursuite des études afin de rentrer en essai clinique (Ahmad et al., 2011).

II. Les protéines kinases

Les protéines kinases (PKs) représentent une famille d'enzymes dont le domaine catalytique (ou domaine kinase) leur permet de modifier la fonction de protéines en catalysant le transfert du γ -phosphate de l'Adénosine TriPhosphate (ATP) (ou de la Guanosine TriPhosphate (GTP)) sur le groupement hydroxyle (-OH) d'un acide aminé (Sérine, Thréonine, Tyrosine) d'une protéine [Figure 15].

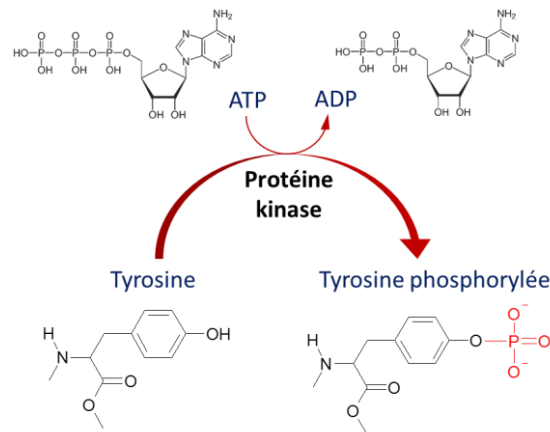


Figure 15 : Mode d'action d'une PK : exemple de phosphorylation d'une protéine sur un résidu Tyrosine.

La plupart des PKs sont capables de phosphoryler les Sérines ou les Thréonines sur la fonction alcool (les Serine/Thréonine ou Ser/Thr Kinases), d'autres phosphorylent spécifiquement les Tyrosines sur leur fonction phénol (les Tyrosines Kinases, ou TK) tandis qu'un dernier groupe possède à la fois une activité Ser/Thr et Tyrosine Kinase, ce sont les protéines kinases à double spécificité. Il existe également des Histidine Kinases, communes chez les procaryotes, les plantes et les eucaryotes primitifs, qui sont capables de s'autophosphoryler sur une Histidine puis de transférer ce phosphate sur des résidus Aspartate d'un substrat.

De cette façon, les PKs sont capables de phosphoryler environ 30% des protéines cellulaires, permettant ainsi de réguler leur activité et de contrôler différents processus essentiels à la vie de la cellule tels que le contrôle du cycle cellulaire, la transduction des signaux ou le métabolisme.

A. Découverte de la phosphorylation réversible des protéines

En 1936, la glycogène phosphorylase est découverte à la fois par Parnas en Pologne (Parnas, 1936) et par Carl et Gerty Cori aux États-Unis (Cori et Cori, 1936). Leurs expériences montrent que l'Adénosine Mono Phosphate (AMP) est indispensable pour l'activité de la phosphorylase. En 1943, une forme différente de cette phosphorylase, active sans ajout d'AMP, est cristallisée (Cori et Green,

1943) et appelée phosphorylase a, en opposition avec la forme dépendante de l'AMP, la phosphorylase b.

Au début des années 50, Edmond Fischer et Edwin Krebs, en voulant extraire la phosphorylase par des techniques plus modernes que celles utilisées par Green et Cori, montrent qu'un extrait brut de muscle contient uniquement la phosphorylase b (inactive). Ils démontrent ainsi que c'est la technique d'extraction de Green et Cori et plus précisément le passage de l'extrait à travers des papiers filtres, qui permet d'obtenir la phosphorylase dans sa forme active. Par la suite, ils montrent que ce sont les ions divalents contenus dans les papiers filtres, et l'ATP, toujours présent dans les extraits de muscles, qui sont responsables de la conversion de la phosphorylase b en a. Ces études leur permettent de supposer que la phosphorylase b inactive est phosphorylée et convertie en une phosphorylase a au cours d'une réaction qui nécessite à la fois du Ca^{++} , du Mg^{++} , de l'ATP et une enzyme qu'ils appellent « phosphorylase kinase ». Ils ajoutent que la réaction inverse est catalysée par une « phosphorylase phosphatase » (Fischer et Krebs, 1955).

Par la suite, ils montrent que le Ca^{++} n'est pas directement impliqué dans l'activation de la phosphorylase mais qu'il est essentiel pour l'activation de la phosphorylase kinase. En 1960, la découverte de l'AMP cyclique (AMPc) (Sutherland et Rall, 1960) permet à Fischer et Krebs de penser que la phosphorylase kinase est activée par une autre protéine kinase qu'ils appellent « kinase kinase ». Cette hypothèse est confirmée lors de la découverte de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) par Walsh et Krebs en 1968 (Walsh et al., 1968) [Figure 16].

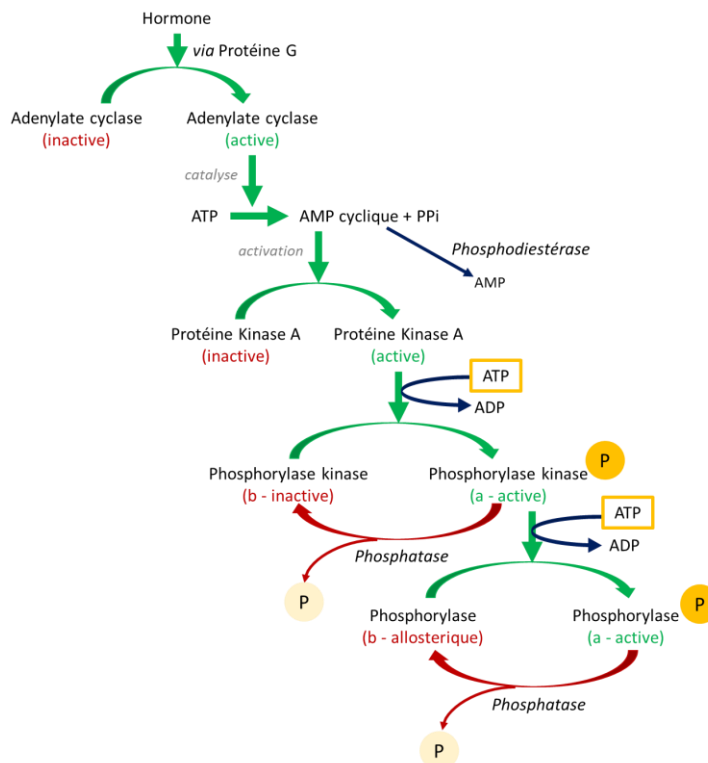


Figure 16 : Cascade d'activation de la Glycogène Phosphorylase.

Suite à l'ensemble de ces travaux, Fischer et Krebs reçoivent le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1992 en récompense de leurs découvertes concernant la phosphorylation réversible des protéines comme mécanisme de régulation.

B. Le domaine kinase

Le domaine kinase, ou domaine catalytique, correspond à une succession de 250 à 300 acides aminés divisés en 12 sous-domaines définis par Hanks et Hunter en 1995 et numérotés de I à XI (Hanks et Hunter, 1995). Ces sous-domaines correspondent à des régions conservées, non interrompues par de grandes insertions et contenant des motifs caractéristiques. Au sein de ce domaine, 12 acides aminés (en rouge dans la suite du texte), définis comme invariants ou presque, sont essentiels pour la fonction de l'enzyme.

Des études se basant sur le domaine catalytique de la Protéine Kinase A α (PKA- α) humaine ont montré que le domaine kinase est formé de deux lobes :

1) Le petit lobe N-terminal [Figure 17a] inclut les sous domaines I à IV. Il est principalement constitué de feuillets β antiparallèles et est impliqué dans l'ancrage et l'orientation du nucléotide.

Le sous-domaine I présente les feuillets β_1 et β_2 reliés par la séquence riche en Glycine (motif **GxGxxG**) correspondant à la boucle de liaison à l'ATP [Figure 17c]. Certaines protéines kinases possèdent une Tyrosine (GxGxYG) dont la phosphorylation entraîne l'inhibition de l'activité. Le sous-domaine II (feuillelet β_3) contient le motif AxK dont la Lysine (**K72**) interagit avec les phosphates α et β de l'ATP et permet ainsi son ancrage et son orientation. Cette interaction est stabilisée par un résidu Glutamine (**E91**) présent dans le sous-domaine III (hélice α C) lorsque celui-ci est en conformation active [Figure 18d].

2) Le grand lobe C-terminal [Figure 17b] comprend les sous domaines VIA à XI. Il est quant à lui principalement constitué d'hélices α et est responsable de la liaison du substrat et de l'initiation du phospho-transfert.

Le sous-domaine VIa (hélice α E) ne possède qu'un rôle structural tandis que le sous-domaine VIb est formé des feuillets β_6 et β_7 séparés par la boucle catalytique et présente le motif H/YRDLKxx**N** [Figure 17e]. L'Asparagine (D166) accepte le proton H^+ provenant de la phosphorylation du groupement hydroxyle. La Lysine (K168) neutralise la charge négative du γ -phosphate et faciliterait ainsi son transfert. L'Asparagine (N171) contribue à stabiliser la boucle catalytique et permet la chélation d'un des ions Mg^{2+} qui pontent les phosphates α et γ de l'ATP. Le sous-domaine VII est formé des feuillets β_8

et $\beta 9$ séparés par la boucle de fixation au Mg^{2+} et possède le motif très conservé **DFG** où l'Aspartate (D184) permet la chélation du deuxième ion Mg^{2+} qui ponte les phosphates β et γ de l'ATP et contribue ainsi à orienter le γ -phosphate pour le transfert [Figure 17d]. Le sous-domaine VIII possède le motif **APE** qui se situe face au site catalytique et aide à stabiliser le lobe par l'interaction du Glutamate (E208) avec une Arginine du sous-domaine IX. Il possède un rôle majeur dans la reconnaissance du substrat mais également dans celle des peptides inhibiteurs. La boucle d'activation, décrite par Taylor et Radzio-Andzelm en 1994, comprend les AA entre les motifs DFG et APE et est impliquée dans l'activité kinase (Taylor et Radzio-Andzelm, 1994). En effet, la plupart des protéines kinases sont activées par phosphorylation d'un résidu en amont du motif APE, ce qui permet à la boucle d'activation d'être positionnée de manière à rendre accessible le site actif. Le sous-domaine IX est constitué d'une hélice α hydrophobe (hélice αF) et possède un Aspartate (D220) qui permet de stabiliser la boucle catalytique par des ponts hydrogène et un résidu Glycine invariant (G225). Le sous-domaine X est peu conservé et le sous-domaine XI possède une Arginine (R280) impliquée dans la structure du domaine. Ces deux sous-domaines forment le cœur catalytique et sont impliqués dans la liaison du substrat.

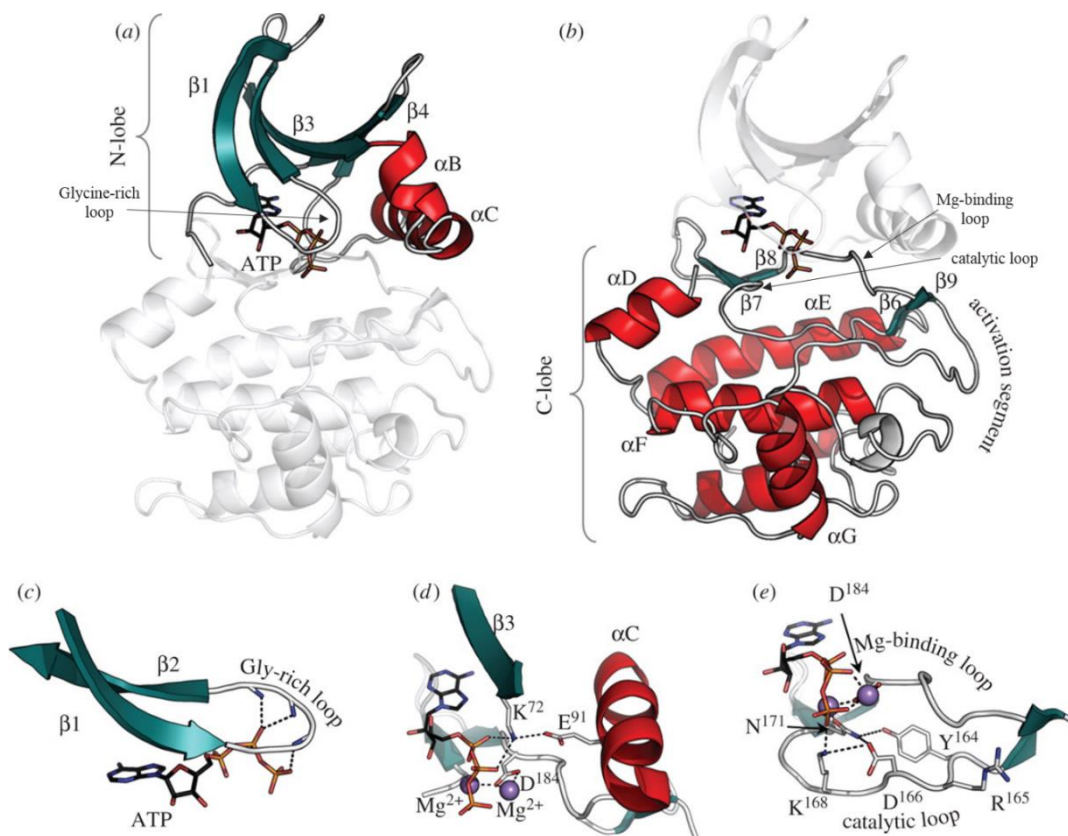


Figure 17 : Structure du domaine kinase basée sur la PKA-C α humaine. Structure du (a) petit lobe N-terminal et du (b) grand lobe C-terminal. Les domaines fonctionnels sont représentés en dessous avec en (c) la boucle riche en Glycine qui permet de lier les phosphates de l'ATP, en (d) la boucle de liaison des ions Mg^{2+} (représentés par les sphères violettes) et en (e) la boucle catalytique. (D'après Taylor *et al.*, 2012).

Le sous-domaine V s'étale sur les deux lobes et le sillon entre les deux lobes forme le site catalytique. Il aide également à l'ancrage de l'ATP en formant des ponts hydrogènes avec l'Adénine ou le Ribose.

On note également la présence de deux colonnes (« spines ») hydrophobes, essentielles pour l'activité kinase, formées d'acides aminés espacés dans la structure primaire du domaine catalytique. Ces structures permettent de lier les deux lobes et ne sont retrouvées que lorsque le domaine est en conformation active : la colonne régulatrice (R-spine) est désassemblée lorsque le domaine est en conformation inactive (Kornev et al., 2006) et la colonne catalytique (ou C-spine) est complétée par l'ATP (Kornev et al., 2008). Ces deux colonnes sont ancrées sur l'hélice αF qui représente l'élément organisateur du domaine kinase [Figure 18].

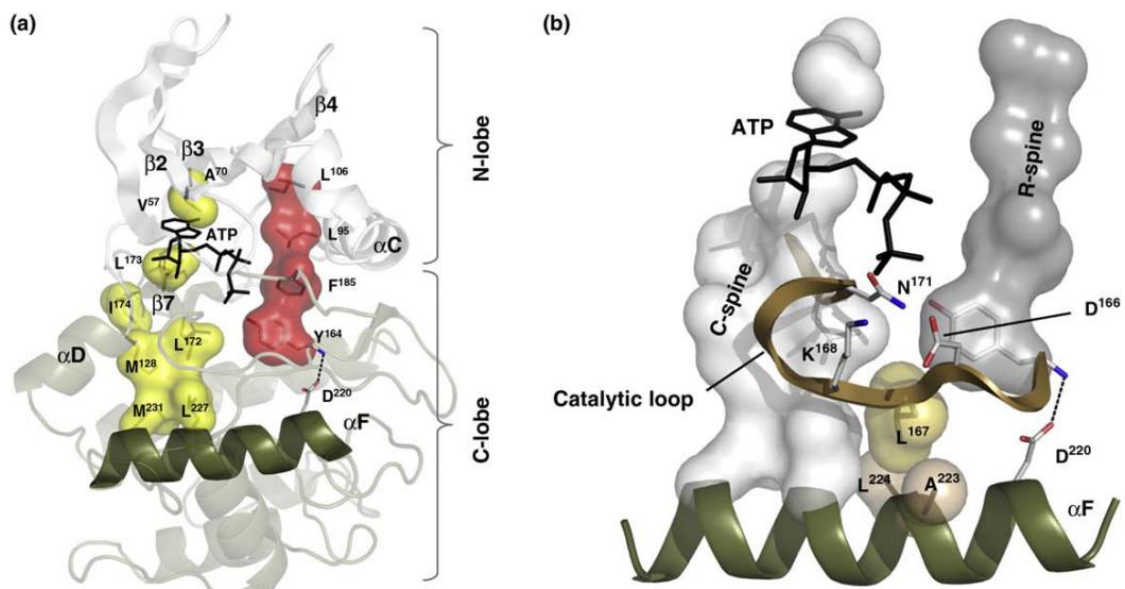


Figure 18 : Les colonnes hydrophobes et l'hélice αF définissent l'architecture interne des protéines kinase. (a) La colonne régulatrice (en rouge) et la colonne catalytique (en jaune) traversent l'ensemble les deux lobes du domaine catalytique. (b) L'ensemble des éléments majeurs du domaine catalytique sont ancrés à l'hélice αF soit directement, soit par l'intermédiaire des colonnes (D'après Taylor et Kornev, 2011).

C. Classification et évolution

La plupart des protéines kinases est regroupée dans la superfamille des protéines kinases eucaryotes (ou ePKs) au sein desquelles le domaine catalytique est bien conservé à la fois structurellement et au niveau de la séquence primaire. On la distingue de la superfamille des protéines kinases atypiques (ou aPKs) qui, bien qu'elles possèdent en général une similarité structurale avec les ePKs, ne présentent pas les motifs usuels et ont donc une séquence primaire très divergente par rapport aux ePKs (Leonard et al., 1998).

D'après Manning et al, il y a 518 protéines kinases connues chez l'Homme dont 478 ePKs et 40 aPKs. Les gènes codant pour les ePKs représentent à eux seuls environ 2% du génome humain et les protéines qu'ils codent permettent de modifier l'activité, la localisation ou l'affinité d'environ 30% des protéines cellulaires. Cela permet aux ePKs de diriger de nombreux processus cellulaires comme la transduction des signaux ou la communication intercellulaire (Manning et al., 2002b).

En 1995, Hanks et Hunter ont proposé une classification des ePKs en groupes, familles et sous-familles basée sur la similarité du domaine kinase, la séquence extra-catalytique et les fonctions biologiques connues de chaque ePK (Hanks et Hunter, 1995). Cette classification s'est agrandie au cours du temps, au fur et à mesure des nouvelles découvertes et a notamment été mise à jour en 2002 [Figure 19] (Manning et al., 2002b).

On classe aujourd'hui les 478 ePKs retrouvées chez l'Homme en 8 groupes distincts :

- Le **groupe AGC** comporte, entre autres, la protéine kinase **A** (PKA), la protéine kinase **G** (PKG) et la protéine kinase **C** (PKC) mais également, parmi les plus étudiées, les protéines Akt, S6K, RSK, PDK1, MSK et GRK. Au total, il comprend 60 des 478 protéines kinases identifiées chez l'Homme qui sont réparties en 14 familles. Il regroupe ainsi de nombreuses kinases modulées par les nucléotides cycliques (AMPc, GMPc), les phospholipides ou le calcium et qui sont essentielles à la signalisation intracellulaire. (Pearce et al., 2010)

- Le **groupe CMGC**, nommé d'après les familles **C**yclin-Dependent Kinase (CDK), **M**itogen-Activated Protein Kinase (MAPK), **G**lycogen Synthase Kinase (GSK3) et **C**DC-Like Kinase (CLK). Il comprend 62 protéines réparties en 9 familles. Ces kinases possèdent diverses fonctions notamment dans le contrôle du cycle cellulaire, la régulation des suppresseurs de tumeurs ou la signalisation intracellulaire. (Varjosalo et al., 2013)

- Le **groupe CaMK** pour **Ca**²⁺/Calmodulin **M**ultifunctional **K**inases. Il comprend les familles de kinases régulées par la Calmoduline et le Calcium CaMK-I et CaMK-II mais également 15 autres familles de kinases qui ne sont pas régulées par le Calcium. Ce groupe compte ainsi 74 protéines chez l'Homme.

- Le **groupe CK1** pour **C**asein **K**inase **1** représente un des plus petit groupes puisqu'il est composé de seulement 12 protéines réparties en 3 familles.

- Le **groupe STE** comprend les 3 familles de protéines homologues aux protéines **Ste** (pour sterile) de levure : Ste7/MAP2K, Ste11/MAP3K et Ste20/MAP4K. Ces protéines sont impliquées dans les cascades de signalisation MAPK et sont au nombre de 47 chez l'Homme.

-Le **groupe des Tyrosines Kinase** (TK) regroupe 90 protéines réparties en 30 familles qui phosphorylent presque exclusivement des Tyrosines, en opposition aux autres kinases qui sont sélectives pour la Sérine ou la Thréonine.

-Le **groupe des Tyrosines Kinase-Like** (TKL) comprend 7 familles qui comportent 43 protéines similaires à la fois au Tyrosine et aux Sérine/Thréonine Kinases.

-Le **groupe des RGC** pour **R**eceptor **G**uanylate **C**yclase comprend une seule famille de 5 protéines contenant un domaine actif guanylate cyclase qui génère le second messenger GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique) et un domaine kinase catalytiquement inactif qui semble avoir une fonction de régulation. Ce groupe est similaire aux TKs au niveau de la séquence du domaine catalytique.

-Les **autres** ePKs (83 au total) ne s'associent à aucune autre protéine ou forment des familles qui n'ont pas de forte similarité avec ces 8 groupes majeurs.

L'ensemble des métazoaires expriment des kinases appartenant à ces 8 groupes différents. La plupart de ces groupes sont également retrouvés chez la levure exceptés les groupes des TK et des TKL qui sont spécifiques des métazoaires et apparus avec le besoin d'un contrôle plus sophistiqué, nécessaire pour le développement, la différenciation et la communication intercellulaire (Manning et al., 2002a).

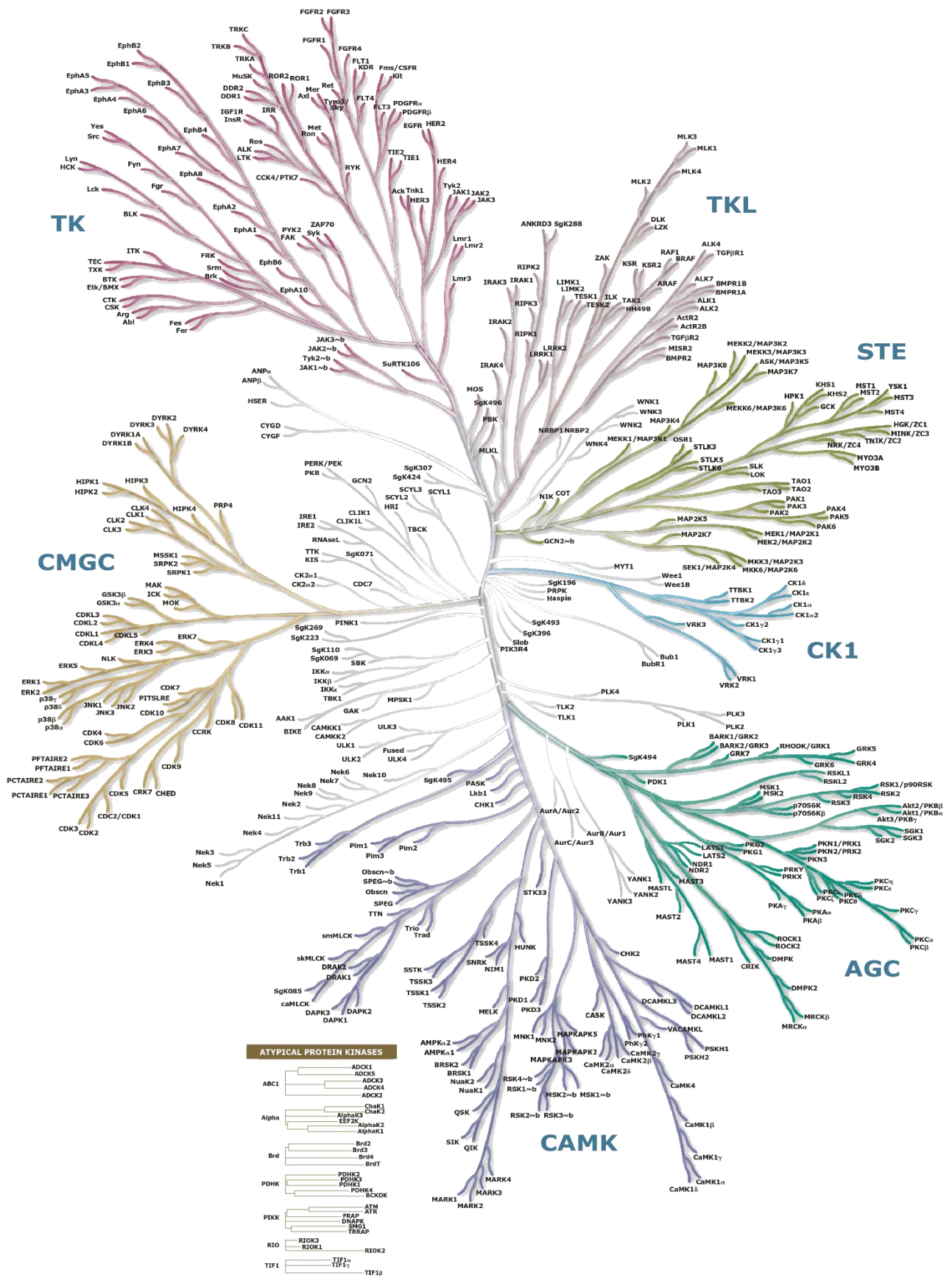


Figure 19 : Arbre non enraciné représentant le « kinome » (ensemble des kinases) humain (D'après Manning *et al.*, 2002b; Cell Signaling technology)

D. Les Tyrosines Kinases

La phosphorylation des protéines sur les résidus Tyrosine est apparue dans l'évolution il y a plus d'un milliard d'années. Celle-ci a été cruciale dans l'évolution des métazoaires puisqu'elle est essentielle à la multicellularité du fait de son rôle dans la communication intercellulaire et tous les signaux de transduction qui en découlent.

C'est lors de l'étude de l'antigène T du polyomavirus SV40 (Eckhart et al., 1979) et de la protéine v-Src du virus du sarcome de Rous (Hunter et Sefton, 1980) que la phosphorylation des protéines sur des Tyrosines a été découverte. Très vite, il a été montré que des récepteurs possèdent également une activité TK comme le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGFR) (Chinkers et Cohen, 1981).

On distingue aujourd'hui deux classes de TKs : les Tyrosine Kinases Cytoplasmiques (CTK) et les Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK). Sur les 90 TKs présentes dans le kinome humain, on compte 58 RTKs et 32 CTKs. Du fait de leurs rôles importants dans différentes voies de signalisation intracellulaire, une régulation fine de ces protéines est indispensable et la dérégulation de leur activité conduit souvent à l'apparition de tumeurs.

1. Les CTKs

Les CTKs, ou NRTK (pour Non-Receptor Tyrosine Kinases) sont réparties en 9 familles différentes en fonction de leur homologie des différents domaines conservés qu'elles possèdent [Figure 20].

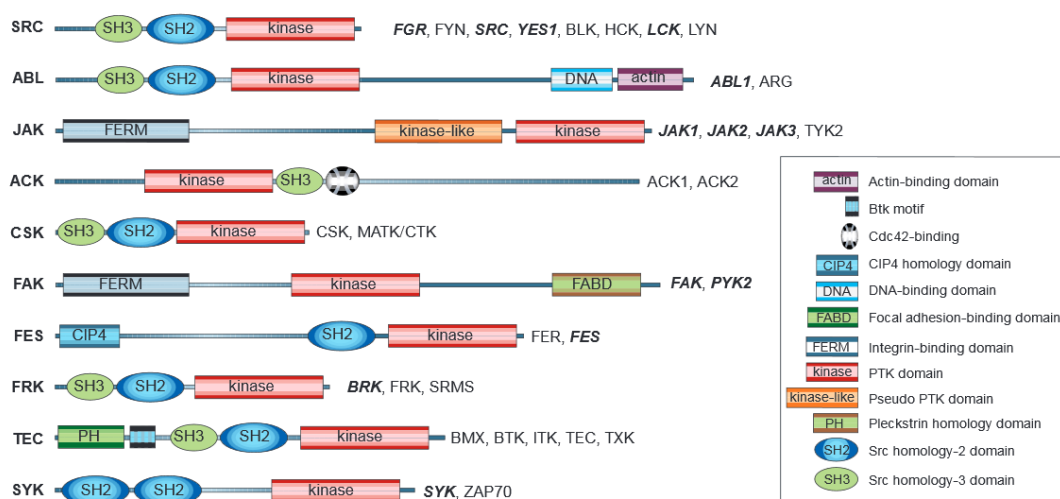


Figure 20 : Les CTKs humaines. La famille est indiquée à gauche, les membres de cette famille sont indiqués à droite. Les protéines indiquées en gras sont impliquées dans le développement de tumeurs malignes. (Fak (Focal adhesion Kinase), Csk (C-terminal Src-kinase), Abl (Abelson leukemia oncogene), Syk (Spleen Tyrosine Kinase), Jak (Janus kinase), Fes (Feline sarcoma kinase), Ack (Activated Cdc-42-associated kinase), Frk (Fyn-related kinase)) (Blume-Jensen et Hunter, 2001).

En plus du domaine Kinase, ces protéines possèdent différents domaines conservés notamment les domaines SH2 (Src Homology region 2) et SH3 (Src Homology region 3).

Les **domaines SH2** ont été identifiés en 1986 par l'équipe de Tony Pawson comme correspondant à une région non catalytique de 80 à 100 acides aminés située immédiatement en position N-terminale des domaines Kinase des CTKs. Ce domaine n'est pas nécessaire à l'activité kinase mais il peut réguler la fonction du domaine kinase et les interactions avec ses cibles (Sadowski et al., 1986). A noter qu'à partir de 1988, il a été montré que des protéines sans activité kinase pouvaient également présenter des domaines SH2, comme la phospholipase C γ 1 (ou PLC γ 1) (Stahl et al., 1988) ou la RasGAP (Ras-GTPase Activator Protein) (Trahey et al., 1988; Vogel et al., 1988). Depuis, il a été montré que les domaines SH2 se lient spécifiquement aux Tyrosines phosphorylées et sont présents au sein d'au moins 110 protéines différentes classées en 11 catégories distinctes selon leur fonction [Figure 21]. Ces protéines servent d'intermédiaires entre les TKs et les voies de signalisation intracellulaires (Liu et al., 2006).

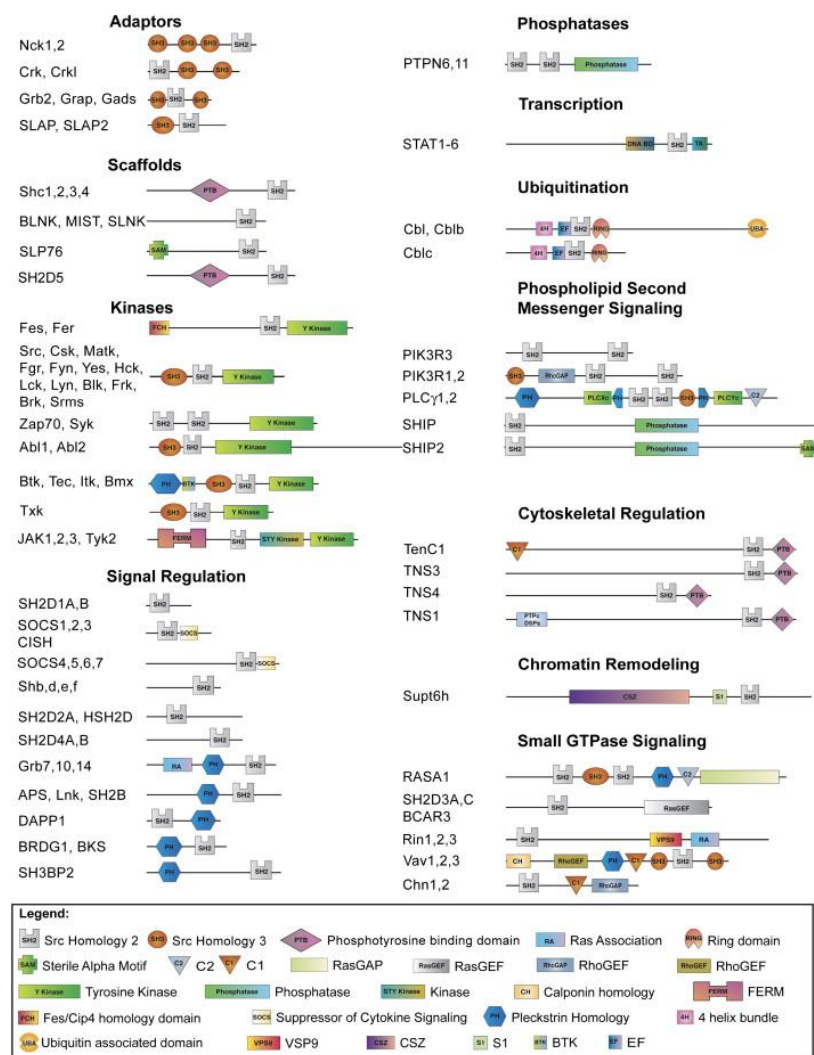


Figure 21 : Classification des protéines à domaine SH2 identifiées chez l'Homme et la souris (Liu et al., 2006).

Les **domaines SH3** ont été identifiés en 1988 comme étant une autre région non-catalytique d'environ 50 acides aminés, présente dans les CTKs Src et Abl et positionnée en N-terminal du domaine SH2 (Stahl et al., 1988). Dans le même temps, des domaines SH3 ont été identifiés, comme pour les domaines SH2, sur la PLC γ 1 et la RasGAP (Stahl et al., 1988; Suh et al., 1988) mais également sur des protéines du cytosquelette (Drubin et al., 1990). Par la suite, il a été montré que les domaines SH3 sont impliqués dans les interactions protéine-protéine essentielles dans la signalisation intracellulaire en se fixant à des séquences riches en Prolines présentant le motif PxxP (Feng et al., 1994).

Ces deux domaines SH2 et SH3 sont donc présents à la fois sur les CTKs mais également sur d'autres protéines et sont déterminants pour la spécificité des interactions protéine-protéine dans la transduction des signaux intracellulaires.

Les CTKs présentent également d'autres domaines conservés tels que les **domaines PH** (**P**leckstrin **H**omology) qui permettent la liaison aux phosphatidylinositol ou les **domaines FERM** (**F** pour 4.1 protein, **E**zrin, **R**adixin, **M**oesin), composés de trois modules structuraux (le C-terminal correspondant à un domaine PH-like) qui se lient au cytosquelette. Ces deux domaines permettent ainsi le recrutement des protéines à la membrane plasmique.

2. Les RTKs

Les RTKs regroupent l'ensemble des 58 TKs transmembranaires présentes chez l'Homme et sont répartis en 20 familles différentes [Figure 22].

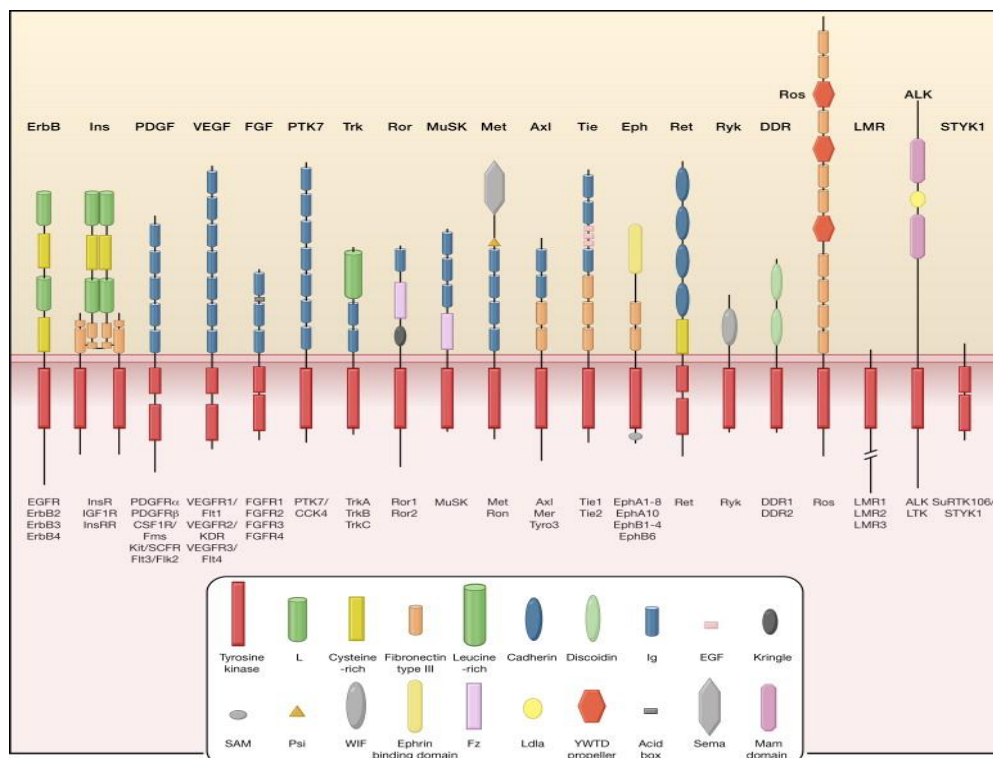


Figure 22 : Les différentes familles de RTKs (Lemmon et Schlessinger, 2010).

Les RTKs sont impliqués dans différents processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie, le métabolisme, la migration cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire. Tous les RTKs présentent la même architecture : une région extracellulaire qui permet la liaison au ligand, suivie d'une hélice transmembranaire unique puis d'une région cytoplasmique qui porte l'activité TK.

a. Mécanismes d'activation

- Fixation du ligand et dimérisation

Tandis que la plupart des RTKs se dimérisent suite à la liaison d'un facteur de croissance, certains forment des oligomères en absence de ligand.

Lorsque la dimérisation est induite par le ligand, celle-ci peut se faire de différentes façons :

- Le ligand, sous forme de dimère, se place à l'interface entre les deux récepteurs permettant ainsi une interaction entre les récepteurs par son intermédiaire (cas du récepteur au Nerve Growth Factor (NGF) TrkA [Figure 23A])
- Le ligand, sous forme de dimère également, se lie aux récepteurs et induit un changement de conformation permettant l'interaction des deux molécules (cas du récepteur KIT [Figure 23B])
- Deux monomères de ligand et une molécule accessoire se lient aux deux récepteurs, permettant leur interaction (cas du récepteur au Fibroblast Growth Factor (FGFR) [Figure 23C])

Les récepteurs à l'Insuline (IR) et à l'Insuline-like Growth Factor (IGF1R) sont exprimés à la surface sous la forme d'hétérotétramères ($\alpha_2\beta_2$) dont les sous-unités sont liées de façon covalente par des ponts disulfure. Dans ce cas, la liaison de l'Insuline induit une modification de la structure du dimère et permet ainsi l'activité kinase. Des études suggèrent que d'autres récepteurs, tels que celui à l'Epidermal Growth Factor (EGFR), Tie2 (récepteur à l'angiopoïétine) et les récepteurs à l'Ephrine (Eph) forment également des oligomères avant la fixation de leur ligand. Dans le cas du récepteur à l'EGF ErbB, deux molécules d'EGF se lient à deux sites différents de l'oligomère, entraînant un changement de conformation du récepteur (Lemmon et Schlessinger, 2010) [Figure 23D].

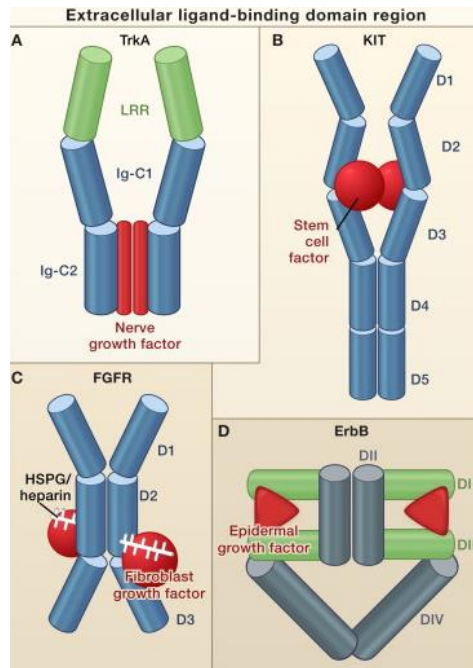


Figure 23 : Différents modes de liaison du ligand et d'activation des RTKs. (A) Le dimère de NGF permet l'interaction entre les deux récepteurs TrkA. (B) Le dimère de SCF se lie à KIT, induisant un changement de conformation et l'interaction entre les deux récepteurs. (C) Deux molécules de FGF et une molécule d'Héparine se lient au FGFR, entraînant sa dimérisation. (D) Les monomères d'EGF se lient simultanément sur le dimère d'ErbB permettant son activité. (D'après Lemmon et Schlessinger, 2010)

- [Levée de l'auto-inhibition et activation](#)

La fixation du ligand et la dimérisation du récepteur conduisent à la levée de son auto-inhibition. En effet, les domaines Tyrosine Kinase sont auto-inhibés par différents mécanismes faisant intervenir diverses interactions spécifiques selon le récepteur.

- **Auto-inhibition par la boucle d'activation** : un résidu Tyrosine de la boucle d'activation se loge dans le site actif bloquant ainsi l'accès à l'ATP et au substrat. Lors de la liaison du ligand, cette Tyrosine d'un des deux domaines TK est phosphorylée par son partenaire. Cette phosphorylation en *trans* interrompt ainsi l'auto-inhibition en *cis*. (Cas de l'InsR et du FGFR [Figure 24A])
- **Auto-inhibition par le domaine juxta-membranaire** : des séquences impliquant des résidus Tyrosine du domaine juxta-membranaire entrent en contact avec le domaine TK, en particulier la boucle d'activation, permettant ainsi de stabiliser la conformation sous forme inactive. La dimérisation du récepteur permet la phosphorylation en *trans* de ces Tyrosines, permettant donc de lever son inhibition et d'induire son activation. (Cas de MuSK, Flt3, KIT, EphR [Figure 24A])

- **Auto-inhibition par la queue C-terminale** : de la même façon, une région de la queue C-terminale bloque l'accès du substrat au site actif. L'auto-phosphorylation des Tyrosines présentes dans cette région permet de lever l'inhibition. (Cas de PDGFR et Ron [Figure 24A])

D'autres récepteurs ne sont pas activés par *trans*-phosphorylation. Par exemple, l'EGFR est activé de façon allostérique : les deux domaines TK forment un dimère asymétrique dans lequel le lobe C-terminal d'un domaine TK « activateur » entre en contact avec le lobe N-terminal du second domaine TK « receveur ». Ce rapprochement permet au lobe N-terminal du « receveur » d'adopter une conformation active sans être phosphorylé [Figure 24B].

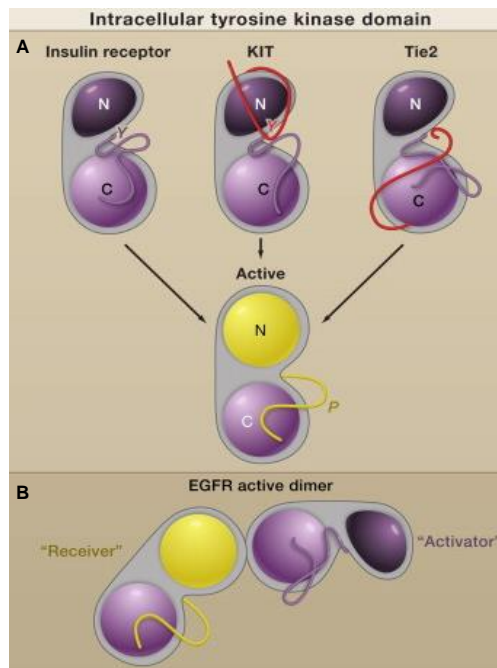


Figure 24 : (A) Les différents modes d'auto-inhibition du domaine tyrosine kinase avec l'exemple du récepteur à l'insuline pour l'inhibition par la boucle d'activation, de KIT pour l'inhibition par le domaine juxta-membranaire, et de Tie2 pour l'inhibition par la queue C-terminale. (B) Activation allostérique du dimère d'EGFR. (D'après Lemmon et Schlessinger, 2010).

Le premier substrat phosphorylé par un RTK est donc le récepteur lui-même : en général, son auto-phosphorylation joue un rôle majeur dans sa régulation et permet au RTK de recruter des partenaires et de phosphoryler un grand nombre de Tyrosines cytoplasmiques.

b. Protéines partenaires des RTKs

Les RTKs se situent au centre d'un réseau complexe de signalisation et ont un rôle essentiel dans la transmission d'informations venant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Comme nous l'avons vu précédemment, leur activation par un ligand extracellulaire va permettre leur activation et le recrutement des protéines partenaires qui pourront, à leur tour, transmettre le signal.

Les protéines partenaires des RTKs possèdent un domaine SH2 ou un domaine PTB (Phospho-Tyrosine Binding) leur permettant de se lier aux Tyrosines phosphorylées du récepteur.

Les **domaines SH2** [Figure 25A], décrits précédemment, se lient à des motifs contenant une Tyrosine phosphorylée. Cette liaison se fait, en partie, *via* une Arginine (présente dans le motif FLV**R**) qui se situe dans une poche conservée chargée négativement. La spécificité de liaison dépend des acides aminés situés en positions +1 à +6 en aval de la Tyrosine phosphorylée.

Les **domaines PTB** [Figure 25B] ont été découverts plus tardivement dans la protéine Shc (Blaikie et al., 1994) et on en retrouve aujourd'hui environ 60 dans le protéome humain. Ils correspondent à une séquence de 100 à 170 acides aminés qui lie les Tyrosines phosphorylées présentes dans le consensus de fixation NPXpY. Contrairement aux domaines SH2, c'est donc les acides aminés en N-terminal de la Tyrosine phosphorylée qui sont importants pour la liaison. De plus, la séquence en acides aminés est beaucoup moins conservée entre les domaines PTB qu'entre les domaines SH2. Il s'est par la suite avéré que beaucoup de PTB peuvent se lier à des protéines indépendamment de leur phosphorylation ou même du motif NPXY et certains PTB peuvent même se lier aux phospholipides (Yan et al., 2002). La structure du PTB ressemble d'ailleurs à celle des domaines PH (Zhou et Fesik, 1995).

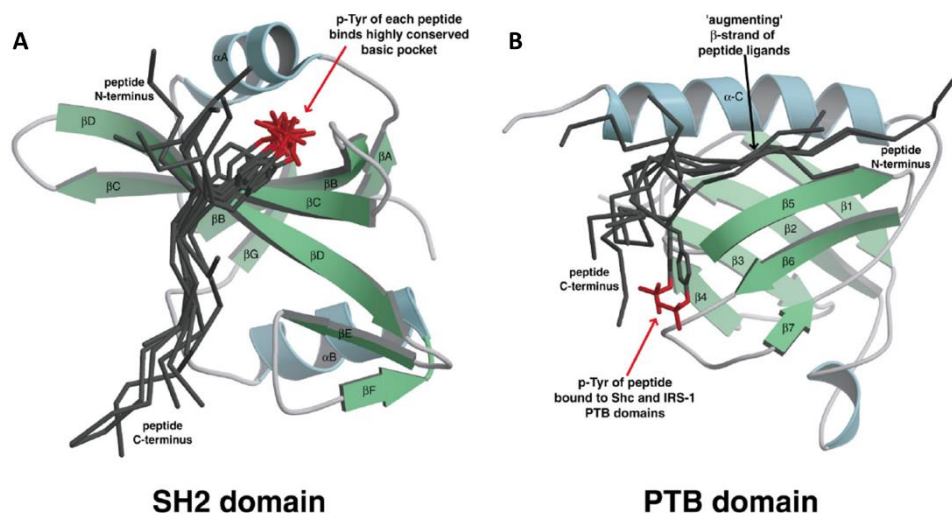


Figure 25 : Structure des domaines (A) SH2 et (B) PTB (Schlessinger et Lemmon, 2003).

Alors que les protéines à domaine SH2 peuvent présenter d'autres domaines, qu'ils soient catalytiques ou non [Figure 22], les protéines à domaine PTB ne présentent pas de domaine catalytique. La présence de domaines d'interaction protéine-protéine ou avec les phospholipides leur permet de transmettre le signal induit par la liaison du ligand sur le RTK.

c. Voies de signalisation associées

Le recrutement de différents partenaires par les RTKs permet l'interaction avec de multiples protéines toutes impliquées dans un réseau de signalisation complexe. De plus, toutes les voies de signalisation sont interconnectées et sont régulées par des phénomènes de rétrocontrôles positifs et/ou négatifs [Figure 26]. L'activation de voies majoritaires par rapport aux autres dépend du niveau d'expression du RTK, de sa localisation et de sa cinétique d'activation.

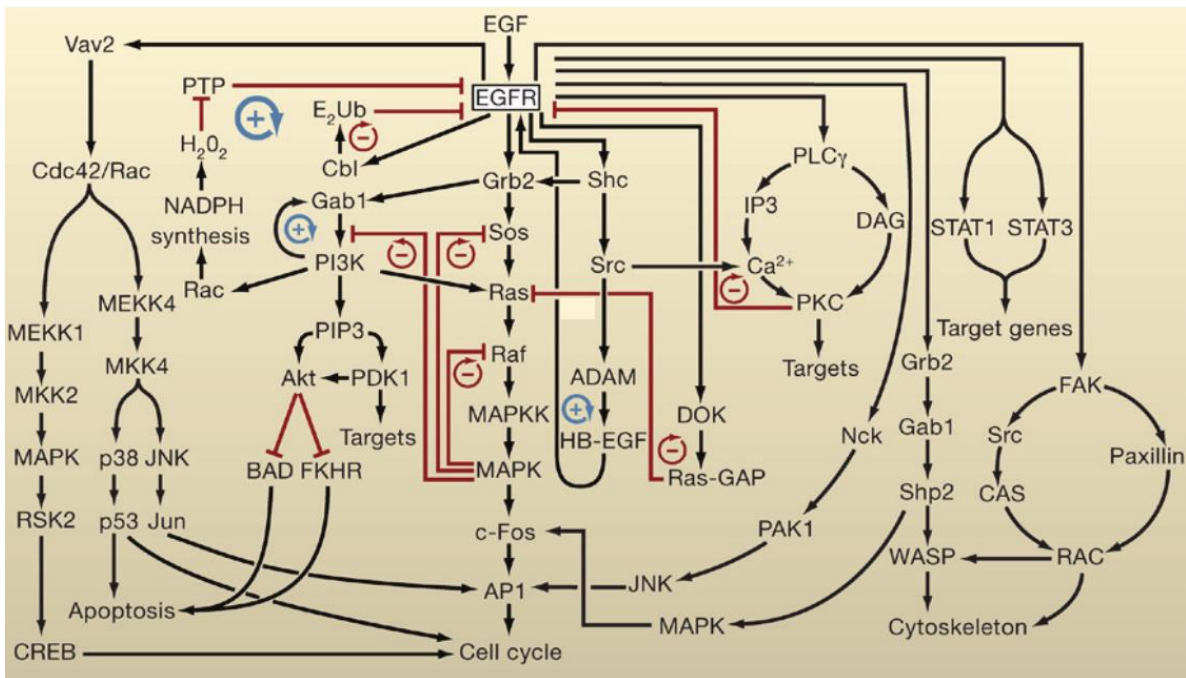


Figure 26 : Voies de signalisation intracellulaires induites par l'EGFR (Lemmon et Schlessinger, 2010).

Les RTKs sont capables d'induire une grande variété de voies de signalisation, parmi les plus connues et les plus étudiées, les différentes voies des MAPKs et la voie PI3K/Akt.

- Les voies des MAPKs

Les MAPKs ont été décrites à la fin des années 1980 (Rossomando et al., 1989) et ont été par la suite classées dans le groupe des CMGC (Hanks et Hunter, 1995). Elles sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires telles que la mitose, la différenciation, la prolifération, l'apoptose, la survie ou la migration.

Les MAPKs sont activées par une cascade de phosphorylation. Brièvement, l'induction du RTK conduit à l'activation d'une « MAP3K » (ou MAPKKK pour Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase) qui peut ainsi activer une « MAP2K » (ou MAPKK) qui va phosphoryler à son tour une MAPK et lui permettre d'agir sur ses différentes cibles [Figure 27].

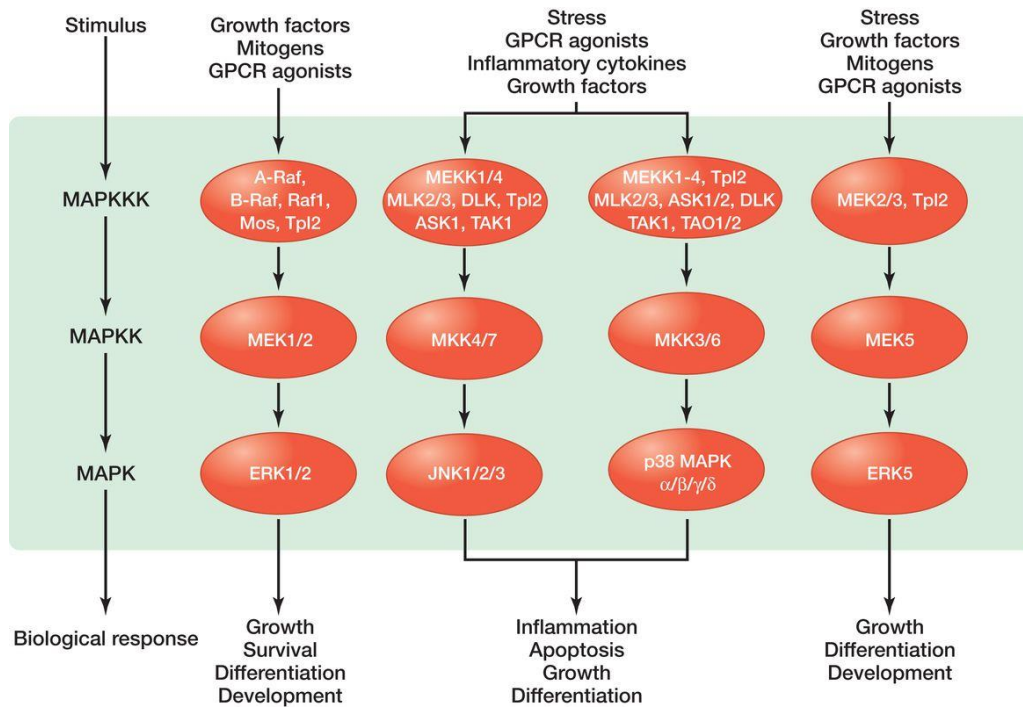


Figure 27 : Représentation schématique des différentes voies MAPKs (Morrison, 2012).

Les MAP3K sont variées et présentent différents modes de régulation. Certaines MAP3K, comme Raf (Matallanas et al., 2011), MEKK4 (Miyake et al., 2007) ou MLK3 (Du et al., 2005), sont activées selon plusieurs étapes : dans un premier temps, la fixation d'une protéine « ligand » leur permet de lever leur auto-inhibition. Cela induit une dimérisation des domaines Kinases et une auto-phosphorylation de la boucle d'activation. Ainsi, elles peuvent procéder à l'activation des MAP2K en les phosphorylant sur deux résidus Sérine et/ou Thréonine présents dans la boucle catalytique (Zheng et al., 1994). Cela permet aux MAP2K de phosphoryler les MAPKs d'abord sur une Tyrosine puis sur une Thréonine toutes deux présentes dans la boucle d'activation selon le motif conservé **TTY**.

On peut regrouper les MAPKs en trois familles :

- Les **protéines ERK** (Extracellular-signal-Regulated Kinase) qui comprennent les premières MAPKs identifiées ERK1 et ERK2 ainsi que ERK5. Elles sont activées par phosphorylation sur le motif **TEY** et les voies ERK1/2 induisent notamment la croissance et la différenciation cellulaire. (McKay et Morrison, 2007; Shaul et Seger, 2007).
- Les **protéines JNK** (c-Jun N-terminal Kinase) parmi lesquelles on compte 3 isoformes : JNK1, JNK2 et JNK3. Elles sont activées par phosphorylation du motif **TPY** et sont notamment impliquées dans la croissance, la différenciation, l'apoptose, le métabolisme ou la migration des cellules. (Weston et Davis, 2007).

- Les **protéines p38** qui comprennent 4 isoformes : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . Elles sont activées par phosphorylation du motif **TGY** et possèdent notamment un rôle dans l'inflammation, l'apoptose, la différenciation et la régulation du cycle cellulaire. (Cuadrado et Nebreda, 2010).

- La voie PI3K/Akt

Les protéines PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) sont des enzymes dimériques constituées d'une sous unité catalytique de 110 kDa associée à une sous unité régulatrice de 85 kDa qui possède un domaine SH2 lui permettant de se lier soit directement aux RTKs, soit à des protéines intermédiaires. Une fois à la membrane, la PI3K convertit le PIP2 (PI-4,5-biphosphate) en PIP3 (PI-3,4,5-triphosphate). L'accumulation de PIP3 permet le recrutement de la PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1) et de la protéine Akt (ou PKB) à la membrane *via* l'interaction de leur domaine PH avec le PIP3.

La protéine Akt1 (ou PKB α) a été identifiée au début des années 1990 par homologie avec les protéines PKA et PKC. Par la suite, deux isoformes ont été découverts : Akt2 (PKB β) et Akt3 (PKB γ). Les protéines Akt sont constituées d'un domaine PH en position N-terminale, d'un domaine kinase central et d'un domaine de régulation C-terminal. L'interaction entre le domaine PH et le domaine kinase permet de maintenir l'enzyme à l'état inactif. Son activité nécessite la phosphorylation de la Thréonine 308 de la boucle d'activation et de la Sérine 473 présente dans la région régulatrice. Lors de l'activation de PI3K, l'interaction d'Akt avec le PIP3 et de cette façon sa colocalisation avec PDK1 permet la phosphorylation de la T308 par PDK1. La S473 est quant à elle phosphorylée par le complexe rictor-mTOR (ou mTORC2) (Sarbassov et al., 2005).

Akt ainsi activée va pouvoir à son tour agir sur de nombreuses protéines impliquées dans divers processus comme la survie cellulaire, la synthèse protéique, la prolifération ou le métabolisme.

E. Les Kinases comme cibles thérapeutiques

Du fait de leur rôle essentiel à toutes les étapes de la vie des cellules, l'activité des kinases doit être finement régulée. Un défaut dans leur contrôle peut aboutir à diverses pathologies développementales ou métaboliques mais également à la formation de tumeurs. Celles-ci sont souvent la conséquence de mutations ponctuelles [Figure 28A]. L'instabilité du génome peut également être une cause de la tumorigenèse en entraînant l'amplification d'une région du chromosome [Figure 29B] ou un réarrangement chromosomique [Figure 28C].

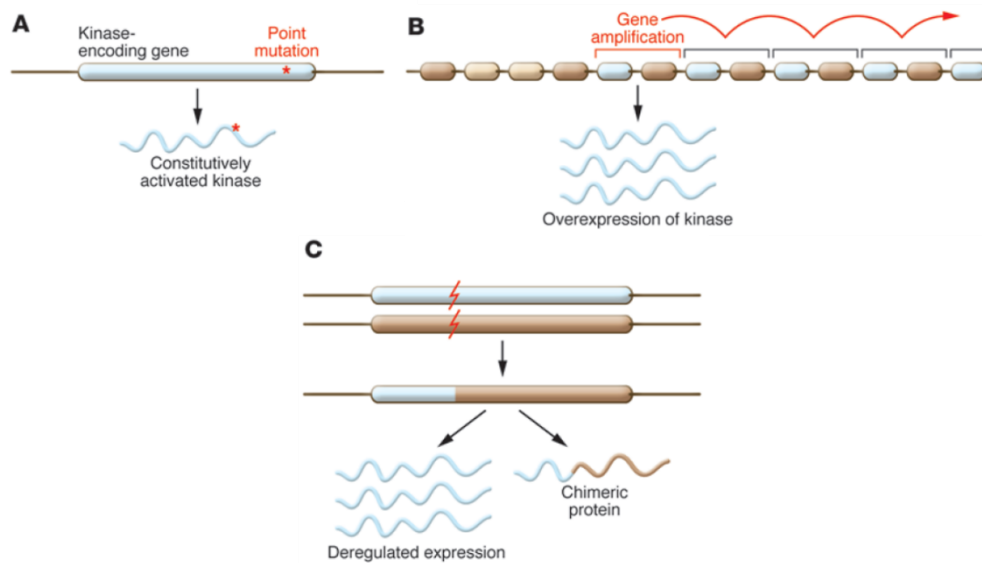


Figure 28 : Modifications génomiques pouvant mener à la tumorigenèse. (A) La mutation ponctuelle du gène codant l'enzyme se produit généralement au niveau du site catalytique et peut entraîner l'expression d'une forme constitutivement active. (B) L'amplification d'une région de chromosome peut entraîner la duplication du gène codant la kinase et ainsi conduire à sa surexpression. (C) La translocation de gène peut déréguler l'expression de la protéine en la positionnant sous la dépendance d'un promoteur plus fort, ou conduire à l'expression d'une forme tronquée ou chimérique de la kinase entraînant son activation constitutive. (D'après Gross *et al.*, 2015).

La translocation chromosomique la plus connue est la translocation de Philadelphie qui correspond à la fusion des gènes BCR (Breakpoint Cluster Region) et ABL1, ce qui conduit à l'expression d'une protéine chimère Bcr-Abl présentant une forte activité tyrosine kinase constitutive. Cette translocation est retrouvée dans 95% des Leucémies Myéloïdes Chroniques (LMC).

Concernant les RTKs, souvent, les cancers qui leurs sont liés peuvent être dus à des mutations ponctuelles empêchant l'auto-inhibition du RTK ou renforçant les liens du dimère permettant ainsi de s'affranchir du ligand.

Différents traitements médicamenteux ont été mis en place pour lutter contre ces pathologies. En général, la stratégie consiste à utiliser des petites molécules inhibitrices qui ciblent le site de liaison de l'ATP des domaines kinases. Il existe également des anticorps monoclonaux empêchant l'activation des RTKs ou ciblant les cellules sur-exprimant un RTK pour qu'elles soient prises en charge par le système immunitaire et détruites.

Par exemple, dans des LMC, un inhibiteur de TK, l'Imatinib (Gleevec), a déjà montré son efficacité en arrêtant la prolifération des cellules hématopoïétiques exprimant la protéine Bcr-Abl induisant un fort taux de rémission des patients traités.

Un autre exemple connu est celui du récepteur ErbB2 (ou HER2 pour Human EGF Receptor 2) dont l'expression est augmentée dans la plupart des carcinomes invasifs du sein (20 à 30%). Cette surexpression est en général due à une amplification du gène codant pour le récepteur et induit une forte prolifération des cellules mammaires et l'acquisition d'un fort potentiel métastatique. Le principal traitement utilisé dans les cancers du sein HER2-positifs est le Trastuzumab (ou Herceptin) qui correspond à un anticorps monoclonal dirigé vers la partie juxta-membranaire du domaine extracellulaire du RTK. La fixation du Trastuzumab inhibe l'activité du récepteur et permet également la destruction des cellules cancéreuses par le système immunitaire (Hudis, 2007; Sergina et Moasser, 2007).

Cependant, un des problèmes majeurs est que souvent, les inhibiteurs sont peu spécifiques et ne ciblent pas qu'une seule et unique Kinase entraînant de nombreux effets secondaires. De plus, les cellules cancéreuses acquièrent régulièrement des mécanismes de résistances aux drogues (Engelman et Settleman, 2008). Ces résistances peuvent être dues à de nombreux mécanismes impliquant soit la kinase elle-même, ses régulateurs, une voie de signalisation parallèle, soit les mécanismes de transport, de distribution ou de stabilité de la drogue. Pour contrer ces résistances, la recherche tend à proposer une combinaison de différents inhibiteurs pouvant agir à différents niveaux des voies de signalisation induites par la surexpression des kinases voire même sur les voies de signalisation parallèles (Gross et al., 2015).

III. Les protéines kinases du schistosome : rôle dans la biologie du parasite

La publication du génome de *S. mansoni* en 2009 a permis l'identification des PKs du parasite. Ainsi, 252 ePKs ont été prédites, représentant près de 2% du protéome putatif du schistosome (Andrade et al., 2011). Très récemment, ce nombre a été réévalué à 259 lors de l'étude du kinome de *S. haematobium* (Stroehlein et al., 2015). Dans cette même étude, 2 ePKs supplémentaires, absentes de *S. mansoni*, ont été identifiées chez *S. haematobium*. D'une manière générale, les kinomes de *S. mansoni* et *S. haematobium* sont très proches (82 à 92% d'identité de séquences). Les deux parasites possèdent des ePKs représentatives de tous les groupes décrits par Hanks et Hunter en 1995, à savoir 39 AGC, 41 CaMK, 9 CK1, 49 CMGC (51 pour *S. haematobium*), 3 RGC, 27 STE, 20 TKL, 31 TK et 40 « autres » (Stroehlein et al., 2015) [Figure 29].

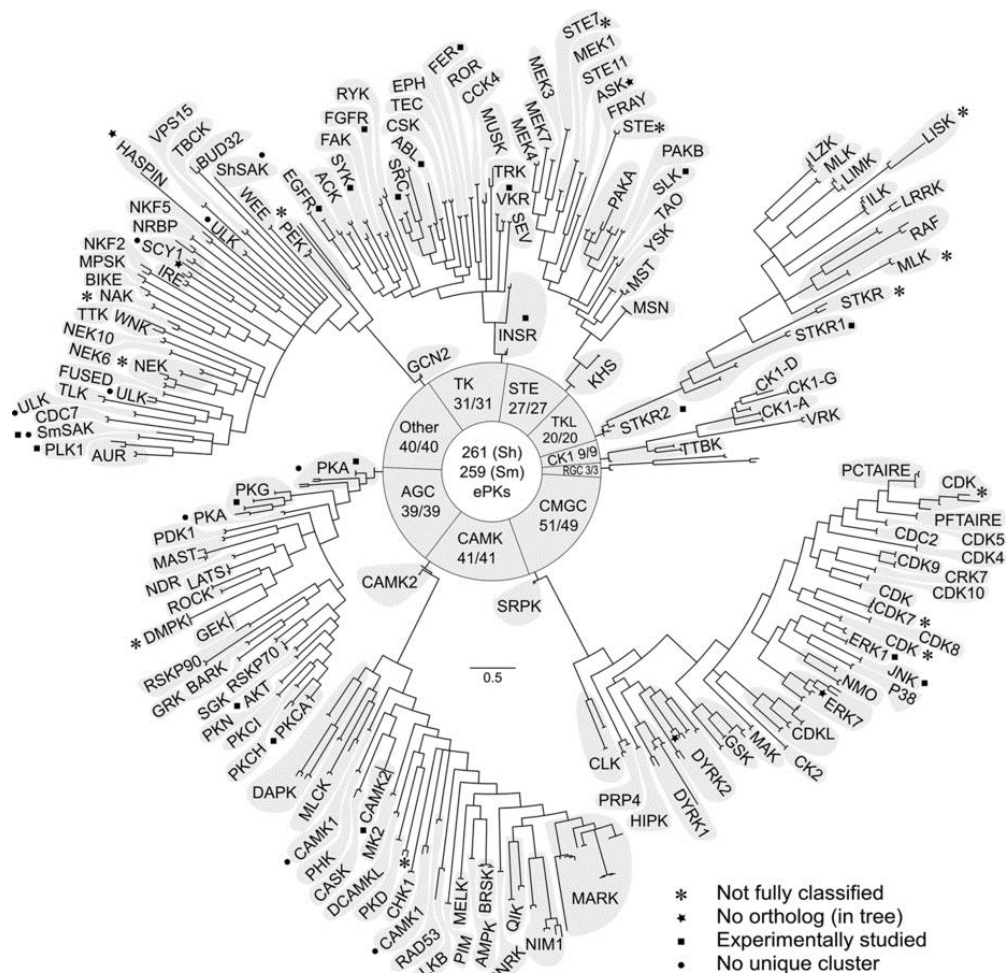


Figure 29 : Arbre phylogénétique des différentes ePKs de *S. mansoni* (Sm) et *S. haematobium* (Sh)

Parmi ces ePKs, certaines ont été étudiées expérimentalement et leur implication dans certaines fonctions essentielles du cycle parasitaire a été démontrée.

A. Les Ser/Thr kinases de *S. mansoni*

Parmi les Ser/Thr kinases du parasite, 13 ont été étudiées expérimentalement. Il s'agit des deux Polo-like kinase (Plks) SmPlk1 et SmSak, de la Ste-20 like kinase SmSLK, des AGC SmPKA, SmcGK1, SmPKC et SmAkt, des MAPKs ERK, JNK et p38 et des récepteurs au TGF β , SmT β RI et SmT β RII.

- SmPlk1 et SmSak

Les Plks, au nombre de 5 chez les mammifères, jouent un rôle essentiel dans la progression du cycle cellulaire, la duplication des centrioles, la mitose, la cytokinèse ainsi que dans la réponse aux dommages à l'ADN (Zitouni et al., 2014). Les différentes Plks sont constituées d'un domaine Ser/Thr kinase en position N-terminale associé à un domaine « polo-box » en C-terminal.

Chez *S. mansoni*, SmPlk1 et SmSak [Figure 30] sont les homologues respectifs des protéines Polo et Sak de *Drosophila melanogaster*.

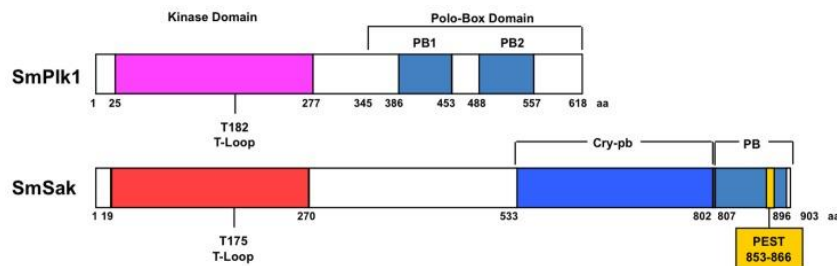


Figure 30 : Structure de SmPlk1 et de SmSak. Les deux protéines sont constituées d'un domaine kinase N-terminal et d'un domaine polo-box C-terminal. Alors que SmPlk1 présente 2 polo-box (PB1 et PB2), SmSak est constituée d'une seule polo-box (PB) et d'une polo-box cryptique (cry-pb). Le motif de destruction PEST est impliqué dans la régulation de la protéine et son renouvellement (Long et al., 2012).

Des études menées dans un modèle d'expression hétérologue, l'ovocyte de xénope, ont mis en évidence la conservation des différentes fonctions de ces protéines. En effet, dans des ovocytes bloqués en métaphase de 1^{ère} division méiotique, un mutant de SmPlk1 actif permet la reprise de méiose *via* la phosphorylation de Cdc25C, phosphatase permettant la translocation du MPF (M-phase Promoting Factor) au noyau (Long et al., 2010). De même, la surexpression de SmSak induit la formation de centrioles *de novo*. De manière intéressante, la surexpression simultanée de SmPlk1 et SmSak entraîne leur interaction et permet l'activation de SmPlk1 et la reprise méiotique (Long et al., 2012).

Au niveau du parasite, les transcrits *Smplk1* et *Smsak* sont présents à tous les stades et sont localisés en particulier au niveau des organes reproducteurs des parasites adultes (Long et al., 2010, 2012).

Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de Plk1, le BI2536, sur des vers adultes en culture, provoque une altération des gonades avec notamment une diminution du nombre de gamètes immatures (oogonies et de spermatogonies) et de spermatozoïdes matures [Figure 31] (Long et al., 2010).

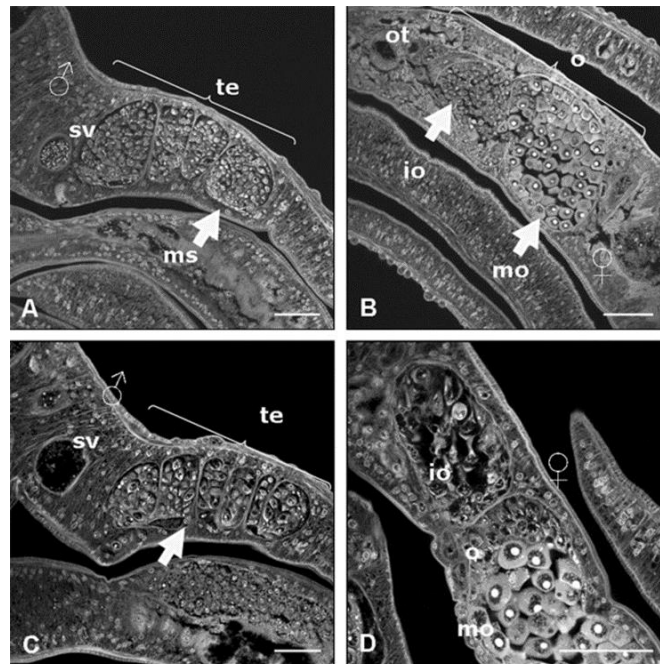


Figure 31 : Effets du traitement au BI2536 (inhibiteur de Plk1) sur les organes reproducteurs de *S. mansoni* après 7 jours de culture, observation au microscope confocal à balayage laser (CLSM). (A, B) Parasites contrôles traités au DMSO, (C, D) Parasites incubés avec 100 nM de BI2536. (te : testicules, sv : vésicule séminale, ms : spermatozoïdes matures, o : ovaire, mo : ovocyte mature, io : ovocyte immature ; échelle = 50µm.) (Long et al., 2010)

- SmSLK

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine Ste20 agit comme une MAP4K dans la voie de signalisation MAPK impliquée dans le « mating ». Chez les mammifères, les protéines Ste20 sont réparties en deux familles en fonction de la position de leur domaine kinase : les PAKs (p21-Activated Kinases) où le domaine kinase est C-terminal et les GCKs (Germinal Center Kinases) où il est N-terminal.

SmSLK appartient ainsi à la famille des GCKs et présente une homologie avec les protéines SLK et LOK (Lymphocyte Oriented Kinase) des mammifères ainsi qu'avec la polo-like kinase kinase 1 de xénope (xPlkk1). Des expériences en ovocytes de xénope et en cellules HEK indiquent que, comme la SLK de souris, SmSLK est capable de phosphoryler JNK. SmSLK possède également une activité Plkk1 vis-à-vis de Plk1 de xénope (Plx1) et de SmPlk1 en ovocyte de xénope.

Chez le parasite, SmSLK est exprimée à tous les stades et la protéine est détectée au niveau du tégument ainsi que dans le parenchyme des vers adultes. Ainsi, SmSLK pourrait être impliquée dans différentes voies kinases essentielles pour la biologie du schistosome (Yan et al., 2007).

- SmPKA

Les PKAs (Protéines Kinases dépendantes de l'AMP cyclique) sont les protéines majeures impliquées dans la signalisation dépendante de l'AMPc chez les eucaryotes. Elles jouent un rôle central dans divers processus biologiques tels que l'expression génique, l'apoptose, la différenciation ou la prolifération cellulaire (Das et al., 2007). Dans son état inactif, PKA est constituée de deux sous unités régulatrices PKA-R liées à deux sous unités catalytiques PKA-C. Lorsque l'AMPc est produit, il se fixe sur les sous-unités régulatrices libérant les sous-unités catalytiques ainsi actives.

Avant la mise en évidence de la présence d'une PKA dans le génome du parasite, des travaux avaient préalablement montré que l'utilisation d'inhibiteurs de PKA réduisait la locomotion des miracidia (Matsuyama et al., 2004). D'autres études indiquaient que l'AMPc était impliqué dans la transformation du miracidium en sporocyste primaire (Kawamoto et al., 1989).

Ces résultats suggérant un rôle important du couple AMPc-PKA dans la biologie des stades larvaires, Swierczewski et Davies ont cloné et caractérisé SmPKA-C en 2009. Les transcrits *SmPKA-C* sont exprimés à tous les stades parasitaires et, chez les vers adultes, la protéine SmPKA est active dépendamment de la quantité d'AMPc. *In vitro*, l'interférence de SmPKA-C ou l'utilisation d'inhibiteurs de PKA (H-89 et PKI 14-22 amide) entraîne la mort des parasites adultes (Swierczewski et Davies, 2009). Par la suite, les auteurs montrent que l'utilisation de ces inhibiteurs à des doses sublétales entraîne une diminution significative de la ponte des parasites. En parallèle, ils ont montré que ces inhibiteurs induisaient la mort des cercaires et que l'utilisation de doses sublétales provoquait un défaut dans leur motilité. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de SmPKA chez les stades larvaires lors de l'invasion de l'hôte puis dans la reproduction du parasite adulte (Swierczewski et Davies, 2010b). Dans le même temps, les auteurs ont montré que PKA-C est conservée à 99% chez *S. japonicum* et *S. haematobium*, faisant ainsi de cette protéine une bonne cible thérapeutique pour lutter contre la pathologie (Swierczewski et Davies, 2010a).

En 2013, la cartographie de l'activité de SmPKA a été réalisée à l'aide d'anticorps commerciaux dirigés contre PKA phosphorylée. Ainsi, il a été montré que SmPKA phosphorylée est généralement associée au tégument, aux ventouses, à l'œsophage et aux muscles somatiques chez les deux sexes. Chez le mâle, SmPKA phosphorylée est également détectée au niveau de la paroi de la vésicule séminale et des muscles du canal gynécophore. Chez la femelle, un marquage est visible au niveau de la paroi de l'ootype, de l'ovaire et de l'utérus.

Lors de l'ajout de Forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (enzyme catalysant la conversion de l'ATP en AMPc), un marquage intense est détecté au niveau du système nerveux central et périphérique des parasites. De plus, l'ajout de Forskoline induit une hyperkinésie des parasites de

façon dose-dépendante. Ensemble, ces données semblent indiquer un rôle neuromusculaire de PKA (de Saram et al., 2013).

- SmcGK1

Les protéines cGK (ou PKG) sont des protéines kinases dépendantes du GMP cyclique. Elles sont notamment impliquées dans la régulation de la locomotion chez diverses espèces (Baker et Deng, 2005). Chez les mammifères, les cGKs de type I et de type II sont formées de deux sous-unités identiques composées chacune d'un domaine N-terminal impliqué dans l'homodimérisation et dans l'inhibition de la kinase, d'un domaine de régulation présentant deux sites de fixation au GMPc et d'un domaine kinase. La liaison du GMPc induit un changement de conformation permettant l'activation du domaine kinase. Les protéines cGKs de type I sont généralement localisées dans le cytoplasme tandis que les cGKs de type II possèdent un site de myristoylation leur permettant de s'ancrer à la membrane plasmique.

Chez le parasite, le domaine kinase de SmcGK1 est proche de ceux des cGKs de type II mais SmcGK1 ne présente pas de site de myristoylation. Le gène est transcrit chez les vers adultes au niveau des gonades et du vitellarium. Lorsque les couples de parasites sont traités avec un inhibiteur de l'enzyme, analogue du GMPc, ils présentent des mouvements ralentis et ont tendance à se désapparier. L'inhibiteur entraîne également une diminution de la ponte. Enfin, le traitement provoque une congestion des ovocytes dans l'oviducte laissant ainsi supposer un rôle de la kinase dans la reproduction du parasite [Figure 32] (Leutner et al., 2011).

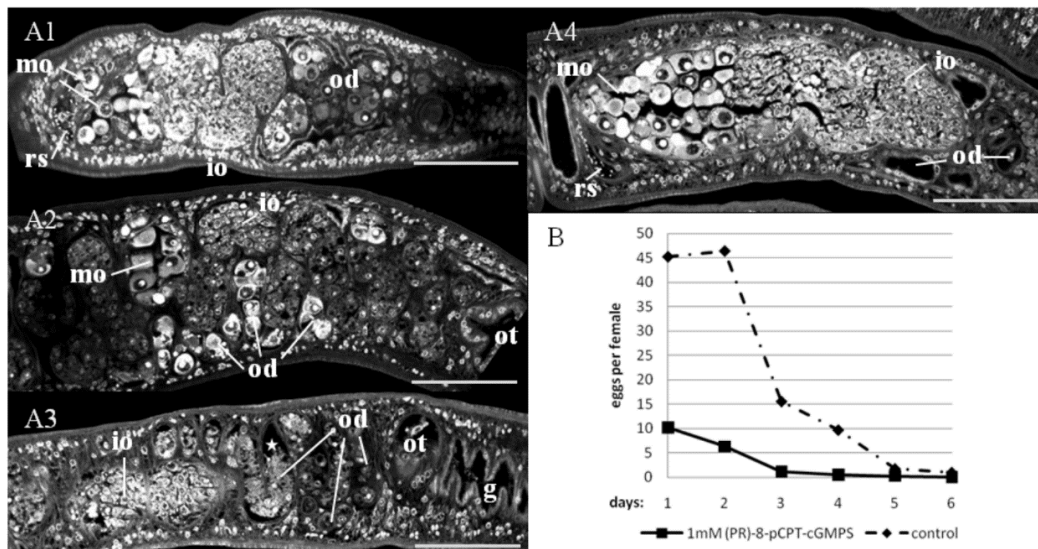


Figure 32 : Impact de l'inhibiteur de cGK ((PR)-8-pCPT-cGMPS) sur la morphologie des femelles (A1-A4) et la production des œufs (B). (A1-A4) Observation au CLSM de parasites traités pendant A1 : 2 jours, A2 : 4 jours, A3 : 6 jours. A4 : contrôle non traité après 2 jours. (g : tube digestif, io : ovocytes immatures, mo : ovocytes matures, od : oviducte, ot : ootype, rs : réceptacle séminal ; échelle : 75 µm). (B) Nombre d'œufs pondus par femelle au cours du temps par des parasites traités ou non traités. (Leutner et al., 2011)

- SmPKC

Les PKCs (ou Protéine Kinase C) sont activées dans les cellules en réponse à une augmentation de diacylglycérol (DAG) ou d'ions calcium (Ca^{++}). Elles jouent ainsi un rôle essentiel dans différentes voies de signalisation contrôlant divers processus physiologiques tels que la migration, la prolifération, l'apoptose,... (Dempsey et al., 2000). Les PKCs sont constituées d'un domaine catalytique associé à un domaine de régulation. L'activation de PKC se fait suite à l'hydrolyse du PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en IP_3 (inositol 1,4,5-triphosphate) et en DAG *via* la PLC γ (Phospholipase C γ). Ainsi, le DAG formé peut se lier à la région régulatrice de la PKC, ce qui augmente l'affinité de la protéine pour les phospholipides membranaires et entraîne donc sa translocation à la membrane. Ce changement de localisation permet à la PKC d'être active et de phosphoryler ses différents substrats.

Chez *S. mansoni*, les premières études ont révélé que l'activité PKC était 9 fois plus importante chez des parasites adultes que dans les stades larvaires (Wiest et al., 1992). Chez le parasite, 4 gènes putatifs codant pour des PKCs ont été détectés, parmi lesquels deux gènes codent pour des PKCs homologues à PKC β humaine (Bahia et al., 2006; Ludtmann et al., 2009). En 2006, un de ces homologues a été cloné et caractérisé : SmPKC1.

SmPKC1 est exprimée à tous les stades parasitaires mais la protéine n'est pas détectée chez les parasites adultes. Il semblerait donc que SmPKC1 ne soit pas le seul responsable de l'activité PKC du parasite. Des expériences d'immunolocalisation ont mis en évidence SmPKC1 au niveau de la masse neurale et des vésicules d'excrétion des sporocystes. Chez les schistosomules de 2h, SmPKC1 est détectée au niveau des glandes acétabulaires et du tégument (Bahia et al., 2006).

A l'aide d'anticorps commerciaux dirigés contre PKC phosphorylée, il a été montré que chez le miracidium, SmPKC est phosphorylée au niveau de la masse neurale, des vésicules de sécrétion, du tégument, des plaques ciliées antérieures, du terebratorium et des cellules germinales. Après transformation en sporocyste, SmPKC phosphorylée est très peu détectée et semble être présente aux abords de la masse neurale. De plus, lors de l'ajout d'un inhibiteur de PKC, la transformation du miracidium en sporocyste est accélérée. L'activité de SmPKC semble donc jouer un rôle dans la régulation de la transformation miracidium-sporocyste (Ludtmann et al., 2009).

Chez le parasite adulte, PKC phosphorylée est détectée au niveau du tégument et notamment des tubercules du mâle, de l'œsophage, des glandes oesophagiennes et de l'utérus. Un marquage est également détecté au niveau des muscles et des plexus neuraux chez le mâle. Le traitement des parasites avec un inhibiteur de PKC (le GF109203X) induit le désappariement des vers, diminue fortement la ponte et provoque un enroulement des vers. Le traitement avec un activateur de PKC (PMA, Phorbol Myristate Acetate) induit également un désappariement des vers et une inhibition de

la ponte. Cependant, les vers ne sont pas enroulés mais sont moins mobiles et apparaissent rigides (Ressurreição et al., 2014).

Les observations ainsi faites confirment celles de 1988 quant à un rôle de PKC dans la contraction musculaire du parasite (Blair et al., 1988).

- SmAkt

Les protéines Akt (ou Protéine Kinase B), au nombre de 3 chez les mammifères, sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la survie, le métabolisme ou l'angiogenèse. De nombreux cancers sont associés à une surexpression d'Akt, dont l'activation est responsable de la survie, de la prolifération et du potentiel d'invasion des cellules tumorales.

Un seul homologue d'Akt a été identifié chez *S. mansoni*. L'étude de SmAkt et de son potentiel en tant que cible thérapeutique pour lutter contre la schistosomiase ont été réalisés durant ma thèse. Ce travail a fait l'objet d'un article de recherche intitulé « Compound library screening identified Akt/PKB kinase pathway inhibitors as potential key molecules for the development of new chemotherapeutics against schistosomiasis » publié dans International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance en décembre 2014. Ce dernier sera présenté dans la partie Résultats.

- SmERK1/2

Des homologues de ERK1 et de ERK2 ont été identifiés dans le kinome de *S. mansoni*. En 2014, Ressurreição et al ont montré que ERK1/2 étaient différentiellement phosphorylés chez les différents stades parasitaires. La fonction de ERK1/2 semble conservée chez le parasite : 1) l'inhibition de MEK, la kinase en amont de ERK1/2, diminue la phosphorylation de SmERK1/2 et 2) SmERK1/2 est capable de phosphoryler Elk-1, un substrat connu de ERK, *in vitro* (Ressurreição et al., 2014).

De la même façon que pour PKC, ERK phosphorylée a été cartographiée chez des parasites adultes. Elle est détectée au niveau des tubules excréteurs et des cellules flammes, de l'œsophage et des tubercules. Chez les femelles, ERK phosphorylée est présente au niveau du réceptacle séminale, de l'utérus, de la paroi de l'ootype et des glandes de Mehlis. Le traitement des parasites avec l'inhibiteur de MEK (U0126) entraîne un désappariement des parasites corrélé à une diminution de la ponte. De plus, les vers appariés présentent des mouvements accélérés (Ressurreição et al., 2014).

Des schistosomules interférés SmERK1/2 ont été injectés chez la souris. Après 37 jours, les vers sont perfusés et les œufs comptés. Alors que le nombre de parasites développés ne varie pas significativement, une diminution du nombre d'œufs présents dans le foie est observée. L'observation des vers ainsi récupérés au CLSM n'a pas mis en évidence de phénotype chez le mâle mais des altérations des organes reproducteurs de la femelle, telles qu'une réduction de la taille de l'ovaire ou

l'absence d'ovocytes matures sont à noter. Lorsque des ovocytes matures sont observés dans l'ovaire, beaucoup se situent également au niveau de l'utérus, à la place des œufs (Andrade et al., 2014).

- Smp38

La publication du génome de *S. mansoni* a permis de mettre en évidence un seul homologue des protéines p38, au nombre de 4 chez l'Homme.

L'utilisation d'anticorps commerciaux dirigés contre p38 phosphorylée sur le motif TGY a permis de mettre en évidence la présence de Smp38 phosphorylée dans des lysats de parasites adultes. De plus, Smp38 phosphorylée immunoprécipitée est capable de phosphoryler ATF-2 (Activating Transcription Factor 2), un substrat connu de p38. Par immunolocalisation, Smp38 phosphorylée est faiblement détectée au niveau des cils des miracidia fraîchement éclos. De façon intéressante, l'observation de miracidia directement dans les œufs met en évidence un marquage plus intense au niveau des cils et du tégument des larves. De plus, des expériences montrent que le traitement des miracidia avec un activateur de p38, l'anisomycine, induit une inhibition de la mobilité des parasites. L'ajout d'anisomycine au milieu accélère également la perte des plaques ciliées lors de la transformation miracidium/sporocyste. Smp38 semble donc réguler la fréquence de battement des cils et jouer un rôle dans la nage du miracidium (Ressurreição et al., 2011a).

Afin de mieux définir le rôle de Smp38 dans la transformation miracidium/sporocyste, les auteurs ont suivi la localisation de p38 phosphorylée au cours de cette transition. Après 4 h de culture, les larves présentent un faible marquage dans les cellules germinales. Ce marquage s'intensifie après 19-28 h de culture : Smp38 active est associée au nouveau tégument, au reliquat de la masse neurale et aux cellules germinales. Après 44 h de culture, Smp38 est associée aux cellules germinales et aux vésicules d'excrétion (cellules flammes) chez les sporocystes primaires. Des expériences supplémentaires ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de p38 (SB203580) réduit l'efficacité de transformation miracidium/sporocyste alors que l'utilisation d'anisomycine accélère cette transformation. Ces résultats indiquent qu'en plus de son rôle dans la locomotion du miracidium, Smp38 est impliquée dans la transition miracidium-sporocyste (Ressurreição et al., 2011b).

- SmJNK

Un seul gène codant pour JNK a été identifié dans le génome de *S. mansoni* (Andrade et al., 2011), homologue à JNK-1 de *Caenorhabditis elegans*.

Comme pour SmERK1/2, des schistosomules interférés pour SmJNK ont été injectés chez la souris. 37 jours plus tard, une diminution du nombre de parasites adultes et d'œufs est observée. L'analyse des vers par microscopie confocale met en évidence un endommagement du tégument des mâles associé à une réduction du nombre de tubercules et à l'apparition de dilatations. Les femelles présentent un

ovaire contenant des ovocytes indifférenciés, tous de même taille. Ces résultats indiquent un rôle probable de SmJNK dans la survie parasitaire (Andrade et al., 2014).

- SmT β RI et SmT β RII

En se basant sur leur structure et leurs caractéristiques fonctionnelles, les membres de la famille des RSTKs (Récepteurs Ser/Thr Kinases) peuvent être de type I ou de type II. En répondant à différents facteurs de croissances tels que le TGF β , les activines et les inhibines ou les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), les RSTKs jouent un rôle important dans la croissance et le développement. Généralement, le ligand se lie au récepteur de type II qui recrute ainsi le récepteur de type I pour former un hétéromère. Le domaine kinase du RSTK II, constitutivement actif, phosphoryle ainsi le RSTK I. Ce dernier peut alors phosphoryler les protéines R-Smads (Smads régulées par un récepteur), induisant ainsi leur translocation au noyau et la régulation de la transcription de gènes cibles. En général, les RSTKs répondant au TGF β ou à l'activine activent les Smads 2 et 3 tandis que les RSTKs activés par les BMPs phosphorylent les Smads 1 et 5 (Wrana, 2000).

En 1998, un premier membre de cette famille, appelé initialement SmRK-1 (*S. mansoni* Receptor Kinase-1), a été identifié chez le parasite. SmRK-1 est un RSTK de type I exprimé à la surface du parasite, au niveau des tubercules du mâle (Davies et al., 1998).

SmRK1 est capable d'interagir avec deux R-Smads du parasite : SmSmad1 et SmSmad2 (Beall et al., 2000). Des études supplémentaires ont montré que le TGF β humain permet l'activation de SmRK1 (ou SmT β RI) induisant ainsi une signalisation impliquant SmSmad2 phosphorylée par le récepteur (Beall et Pearce, 2001; Osman et al., 2001).

Les transcrits de SmT β RI sont localisés au niveau du parenchyme, mais également des cellules vitellines et des ovocytes chez la femelle (Knobloch et al., 2004).

En 2006, un récepteur au TGF β de type II est identifié dans le génome du parasite : SmT β RII. SmT β RII est localisé à la surface des parasites femelles et au niveau des tubercules du mâle. La localisation de SmT β RII par FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) a mis en évidence un marquage des transcrits au niveau des cellules vitellines, des cellules épithéliales du tube digestif et des cellules sub-tégumentaires. L'interaction entre SmT β RI et SmT β RII, ainsi que leur capacité à phosphoryler SmSmad2 suite à la fixation du TGF β ont été démontrées *in vitro*. De plus, il a été démontré que cette voie régule la transcription de SmGCP (Gynecophoral Canal Protein), protéine favorisant le contact mâle-femelle (Osman et al., 2006).

En 2007, SmInAct (*S. mansoni* Inhibin/Activin), un homologue du TGF β a été cloné et caractérisé chez le parasite. Exprimé dans l'ovaire et le vitellarium, des expériences d'interférence ont démontré un rôle de SmInAct dans l'embryogenèse des œufs (Freitas et al., 2007).

Enfin, il a été montré que l'utilisation du TRIKI (T β R ser/thr Kinase Inhibitor) réduit l'activité mitotique des cellules vitellines et la production d'œufs (Knobloch et al., 2007). L'ensemble de ces résultats indique que la voie du TGF β du parasite semble jouer un rôle important dans sa reproduction ainsi que dans l'embryogenèse.

B. Les Tyrosine Kinases de *S. mansoni*

Parmi les 31 TKs du parasite, différents CTKs et RTKs ont été étudiés expérimentalement.

1. Les CTKs de *S. mansoni*

- SmFes

SmFes appartient à la famille des kinases Fes/Fps/Fer (Feline sarcoma/Fujinami poultry sarcoma/Fes related). Les protéines de cette famille sont constituées de 3 régions « coiled-coil », d'un domaine SH2 et d'un domaine tyrosine kinase [Figure 33] (Ludolf et al., 2007).



Figure 33 : Organisation structurale de la protéine SmFes (Bahia et al., 2007).

SmFes est exprimée à tous les stades parasitaires, notamment dans les stades cercaires et schistosomules de 2h. En revanche, la protéine n'est plus détectée dans les schistosomules *in vitro* de 7 jours. SmFes est localisée dans le tégument chez les cercaires, des schistosomules de 2h et des miracidia. Chez ces derniers, SmFes est également localisée au niveau du terebratorium.

Ces résultats suggèrent un rôle de SmFes dans la pénétration de l'hôte, à la fois de l'hôte intermédiaire par le miracidium et de l'hôte définitif par la cercaire. La protéine semble également impliquée dans le processus de transformation des deux larves (Bahia et al., 2007).

- SmTK4

SmTK4 appartient à la famille des kinases Syk (Spleen tyrosine kinase). Les Syk sont constituées d'un tandem de domaines SH2 séparés du domaine kinase par un linker [Figure 34]. La liaison de chacun des domaines SH2 à un ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) de la partie intracellulaire d'un récepteur entraîne un changement de conformation de la kinase permettant son activation.



Figure 34 : Structure de SmTK4 (Beckmann et al., 2010a).

Chez le parasite, SmTK4 est exprimé dans les testicules du mâle et dans l'ovaire de la femelle (Knobloch et al., 2002). L'interférence de SmTK4 ou l'inhibition par un inhibiteur spécifique des kinases Syk (Piceatannol) entraîne une diminution de la taille des testicules et une réduction du nombre de spermatocytes chez les mâles. Chez la femelle, une augmentation du ratio ovocyte matures/ovocytes immatures est observée [Figure 35] ainsi qu'une diminution de 50% du nombre d'œufs pondus (Beckmann et al., 2010a).

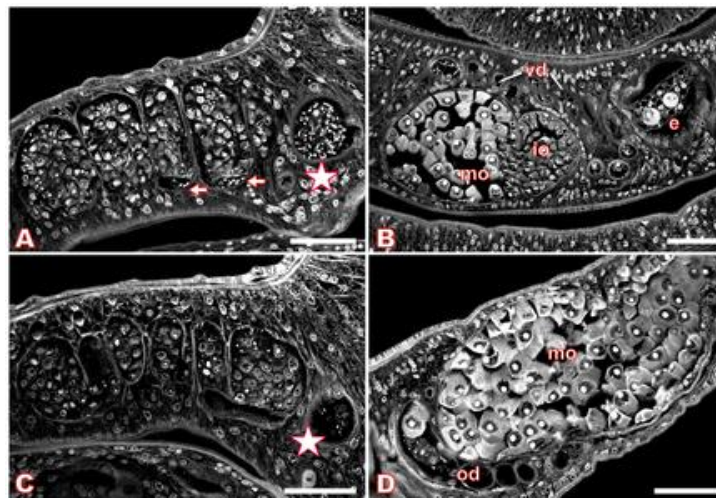


Figure 35 : Morphologie des organes reproducteurs du parasite après l'inhibition de SmTK4 par le Piceatannol. Observation au CLSM de parasites contrôles non traités (A et B) et de parasites traités avec 70 µM de Piceatannol (C et D) après 7 jours de culture. (e : œuf, io : ovocyte immature, mo : ovocyte mature, od : oviducte, vd : vitelloducte, les étoiles indiquent les vésicules séminales, les flèches indiquent les spermatozoïdes matures ; échelle : 40 µm) (Beckmann et al., 2010a).

L'ensemble de ces résultats indique un rôle potentiel de SmTK4 dans la régulation de la gamétogenèse du parasite.

- SmTK3 et SmTK5

Les protéines Src sont des kinases bien étudiées jouant un rôle essentiel dans les voies de signalisation induites par divers récepteurs membranaires. La famille des kinases Src est constituée des protéines de la sous famille SrcA (Src, Fyn, Yes, Fgr), de la sous famille SrcB (Lck, Hck, Blk, Lyn) et des protéines Frk. Ainsi, les Src présentent différentes fonctions dans la mitose, l'organisation du cytosquelette et des plaques focales d'adhésion.

Chez le parasite, deux kinases Src (SmTK3) et Fyn (SmTK5), exprimées à tous les stades parasitaires, ont été caractérisées [Figure 36].



Figure 36 : Structure de SmTK3 (Beckmann et al., 2011).

Des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunolocalisation ont mis en évidence la présence de SmTK3 au niveau du parenchyme et des cellules reproductrices (ovocytes, spermatocytes et cellules vitellines) des parasites. Ces résultats laissent supposer un rôle de SmTK3 dans la reproduction du parasite. *In vitro*, il a été montré que SmTK3 est capable de phosphoryler p130Cas, une protéine adaptatrice, substrat majeur des protéines Src, indiquant ainsi une conservation de la fonction de la protéine. De plus, les partenaires et/ou les substrats potentiels de SmTK3 identifiés sont en faveur d'un rôle possible de la kinase dans l'organisation du cytosquelette (Kapp et al., 2004).

Les transcrits de SmTK5 sont également localisés dans le parenchyme, les organes reproducteurs et le gastroderme des parasites ainsi que dans le vitellarium des femelles (Knobloch et al., 2002).

La culture de vers adultes en présence d'Herbimycine A, un inhibiteur ciblant les kinases Src, entraîne une diminution de la synthèse d'ADN et de la ponte chez les femelles [Figure 38]. Ces résultats sont favorables à l'idée d'un rôle des protéines Src dans le développement et dans la reproduction du parasite (Knobloch et al., 2006).

De manière intéressante, des expériences réalisées en combinant l'inhibiteur des T β R (TRIKI) et des Src (Herbimycine A) ont mis en évidence une synergie entre les voies de signalisation dépendantes du TGF β et la signalisation impliquant les Src chez le parasite. En effet, alors que l'un ou l'autre des inhibiteurs entraîne une diminution de l'activité mitotique des femelles et de leur production d'œufs, l'association des deux inhibiteurs induit une réduction plus drastique de ces deux mécanismes [Figure 37] (Knobloch et al., 2007).

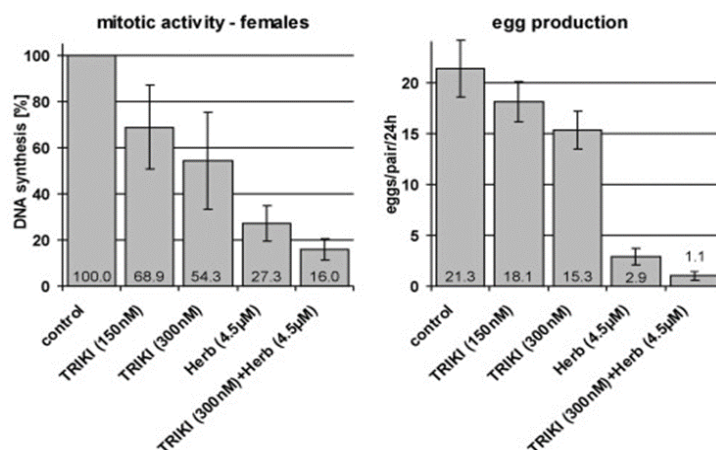


Figure 37 : Effets des inhibiteurs des T β R (TRIKI) et des Src (Herb), seuls ou associés, sur la synthèse d'ADN des femelles (à gauche) et sur leur ponte (à droite) (Knobloch et al., 2007).

L'analyse transcriptomique de parasites traités avec les deux inhibiteurs, ensemble ou séparément, a également permis de confirmer indirectement une coopération des deux voies et leur rôle dans la production des œufs. En effet, une partie des gènes semblablement régulés sont impliqués dans la mitose et dans la formation de la coquille de l'œuf (Buro et al., 2013).

- **SmTK6**

SmTK6 a été initialement identifiée comme partenaire de SmTK4 (Beckmann et al., 2010a). L'analyse phylogénétique de SmTK6 montre que la protéine est à la fois proche des Src et des kinases Abl (Abelson kinase) [Figure 38] (Beckmann et al., 2011).



Figure 38 : Structure de SmTK6 (Beckmann et al., 2011).

Les transcrits de SmTK6 sont localisés dans le parenchyme des deux sexes, dans les testicules, dans l'ovaire et plus légèrement dans le vitellarium (Beckmann et al., 2010a). Du fait de son statut de protéine « hybride » Src/Abl, l'activité de SmTK6 est inhibée à la fois par l'inhibiteur de Src (Herbimycine A) et par l'inhibiteur d'Abl (Imatinib). SmTK6 interagit avec diverses protéines telles que SmTK3, SmVKR1 ou encore SmDLG (Discs-Large), une protéine impliquée dans la croissance ovocytaire. La co-localisation de l'ensemble de ces protéines aux ovaires et les données acquises sont en faveur de l'hypothèse d'un complexe SmVKR1-SmTK6-SmTK3-SmTK4-SmDLG impliqué dans l'ovogenèse (Beckmann et al., 2011).

- **SmAbl1 et SmAbl2**

En plus de SmTK6, 2 kinases Abl ont été identifiées dans le génome de *S. mansoni* : SmAbl1 et SmAbl2 [Figure 39] (Beckmann et Greveling, 2010).

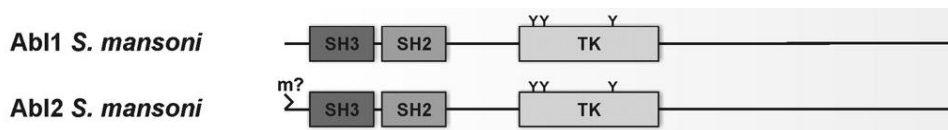


Figure 39 : Structure protéique de SmAbl1 et SmAbl2 (Beckmann et al., 2011).

Les transcrits de SmAbl1 et SmAbl2 sont principalement localisés autour de l'ootype et sont également présents au niveau de l'ovaire, du vitellarium, des testicules et plus faiblement dans le parenchyme et le gastroderme.

L'ajout d'un inhibiteur d'Abl (Imatinib) entraîne rapidement le désappariement des parasites puis leur mort en 3 à 4 jours. Phénotypiquement, l'inhibiteur provoque l'apparition de renflements semblant correspondre à une dégradation du gastroderme. L'analyse des parasites traités par microscopie

confocale met également en évidence une désorganisation complète de l'ovaire marqué par la présence d'ovocytes apoptotiques. Les cellules vitellines apparaissent également désorganisées et apoptotiques. Chez les mâles, une diminution de la taille des lobes testiculaires est observée, accompagnée d'un défaut de spermatozoïdes matures. Chez les deux sexes, une désintégration du gastroderme est visible [Figure 40] (Beckmann et Greveling, 2010).

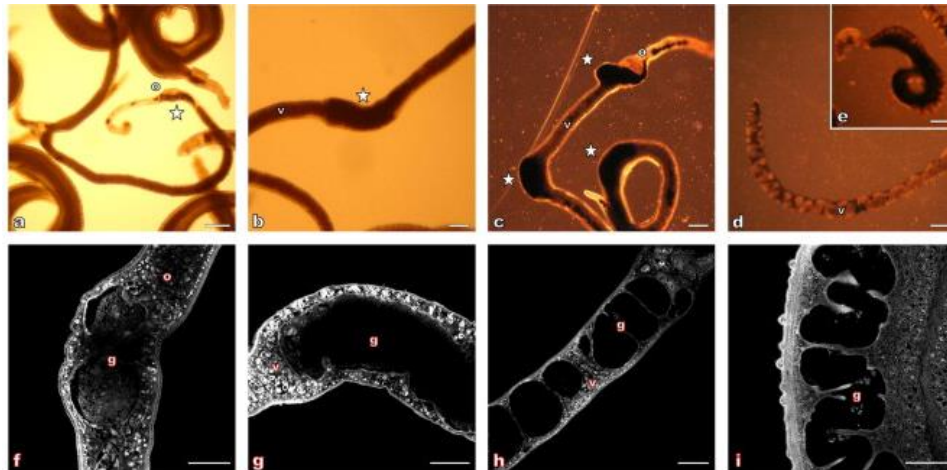


Figure 40 : Impact de l'Imatinib sur la morphologie des parasites. Les parasites sont observés en microscopie optique (a-e) et en microscopie confocale (f-i). Après 24h de traitement avec 100 μM d'Imatinib, la plupart des femelles présentent des renflements (indiqués par des étoiles), souvent positionnés postérieurement à l'ovaire et au niveau du vitellarium (a-c et f, g). Après 96h de traitement avec 10 μM d'Imatinib, le corps de parasites apparaît gonflé. (o : ovaire, g : tube digestif, v : vitellarium ; échelle (a-e) : 50 μm ; échelle (f-i) : 100 μm) (Beckmann et Greveling, 2010).

L'Imatinib présente des effets pléiotropes chez les parasites puisqu'il induit une modification de l'expression de gènes impliqués dans divers processus tels que ceux associés à la surface, au tube digestif, aux muscles et aux gonades (Buro et al., 2014). De plus, la comparaison *in silico* des données transcriptomiques obtenues lors du traitement des parasites avec l'Imatinib et de celles obtenues lors du traitement avec le TRIKI (Buro et al., 2013) met en évidence des gènes régulés de la même façon indiquant une possible association des voies dépendantes du TGF β et de la signalisation impliquant les protéines Abl (Buro et al., 2014).

2. Les RTKs de *S. mansoni*

- [Le récepteur à l'EGF SER](#)

Les EGFRs (Epidermal Growth Factor Receptor) appartiennent à la famille des RTKs ErbB. Lors de la fixation de leur ligand, les EGFRs se dimérisent, ce qui permet leur trans-autophosphorylation. Ainsi, les protéines adaptatrices peuvent se lier au récepteur et transduire le signal vers différentes voies de signalisation, notamment la voie ERK qui est impliquée dans l'activité mitotique du récepteur.

Un homologue de l'EGFR, SER (pour Schistosome Epidermal growth factor Receptor), a été identifié et cloné en 1992 (Shoemaker et al., 1992). SER est actif et est principalement détecté au niveau des muscles des vers suggérant un rôle dans la fonction musculaire du parasite (Ramachandran et al., 1996). Par la suite, des études en systèmes hétérologues (cellules MDCK et ovocytes de xénope) ont mis en évidence l'activation de SER par l'EGF humain ainsi que la capacité du récepteur phosphorylé à activer la voie ERK. De plus, bien que majoritairement exprimé chez les adultes, en particulier chez le mâle, SER est présent à tous les stades du parasite. D'ailleurs, lors de l'ajout d'EGF sur des sporocystes en culture, une augmentation de la synthèse d'ADN et de la phosphorylation des protéines est observée, concordant avec l'augmentation d'une activité mitotique dépendante de la voie ERK activée par SER (Vicogne et al., 2004).

- [Les récepteurs à l'insuline SmIR1 et SmIR2](#)

Les récepteurs à l'insuline (IRs) sont présents sous forme d'hétérotétramères constitutifs. La fixation de l'insuline entraîne un changement de conformation du récepteur, permettant sa phosphorylation puis l'activation de cascades de signalisation *via* le recrutement de protéines partenaires, en particulier IRS (Insulin Receptor Substrate) ou SHC (Src-Homology Collagen) qui se lient au motif de fixation « NPXY ». Les fonctions de l'IR dans la croissance et dans la régulation métabolique sont conservées à travers les espèces vertébrées et invertébrées. Cependant, alors qu'un seul IR est généralement présent chez les invertébrés pour remplir ces deux fonctions, les vertébrés possèdent deux récepteurs : l'IR, spécialisé dans la régulation métabolique, et l'IGF-1R (Insulin-like Growth Factor-1 Receptor), impliqué dans la croissance (Kim et Accili, 2002).

Deux IRs ont été identifiés chez *S. mansoni* : SmIR1 et SmIR2. La structure des SmIRs est conservée, excepté le motif « NPXY » qui est absent de SmIR1. Les séquences des deux SmIRs sont relativement différentes puisqu'ils ne partagent que 25,6 % d'identité. Des expériences d'interaction en système de double hybride en levure ont permis de montrer que les domaines de liaison au ligand de SmIR1 et SmIR2 sont tous deux capables de lier la pro-insuline humaine.

Les deux récepteurs sont transcrits et traduits à tous les stades parasitaires. SmIR1 est exprimé au niveau des muscles, de l'épithélium intestinal et de la membrane basale du tégument chez l'adulte

ainsi que dans le tégument du schistosomule. SmIR2 est quant à lui préférentiellement traduit au niveau du parenchyme à la fois chez les adultes et les schistosomules (Khayath et al., 2007). L'ajout d'insuline humaine dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la prise de glucose par les parasites (adultes et schistosomules). En revanche, le traitement des schistosomules avec des inhibiteurs commerciaux d'IR (les tyrphostines AG1024 et AG538) ou des ARN interférents dirigés contre *SmIR1* diminuent cette prise de glucose (Ahier et al., 2008). De manière intéressante, SmIR1 est co-localisé dans le tégument avec les transporteurs de glucose SGTP1 et SGTP4, eux-mêmes impliqués dans la prise de glucose de l'hôte (Skelly et Shoemaker, 1996).

Ainsi, les différences entre SmIR1 et SmIR2 laissent supposer une dichotomie fonctionnelle entre les deux récepteurs : en effet, SmIR2 pourrait, comme les IGF-1R, présenter une fonction dans le contrôle de la croissance, alors que SmIR1 serait plutôt impliqué dans la régulation de la prise de glucose (Dissous et al., 2007).

Les IRs de *S. japonicum*, SjIR1 et SjIR2, partagent respectivement 70% et 74% d'identité avec SmIR1 et SmIR2 (You et al., 2010). L'immunisation de souris avec le sous-domaine L1 de SjIR2, contenant les sites de liaison à l'insuline, induit une réponse immunitaire forte conduisant à la diminution du nombre d'œufs pondus par les parasites ainsi qu'à un retard de développement des vers. Ces résultats pourraient ouvrir la voie à l'élaboration d'un vaccin à usage vétérinaire qui pourrait bloquer la transmission de *S. japonicum* en Chine et aux Philippines (You et al., 2012, 2015).

- [Les récepteurs au FGF SmFGFR-A et SmFGFR-B](#)

Les FGFRs (Fibroblast Growth Factor Receptors) sont des RTKs bien conservés chez les métazoaires. Ils contrôlent différents processus cellulaires tels que la division, la différenciation, la migration et l'apoptose. Ils jouent un rôle crucial dans l'organogenèse lors du développement embryonnaire et sont impliqués dans la régulation de processus physiologiques tels que la régénération, l'homéostasie ou l'angiogenèse chez les adultes (Turner et Grose, 2010). Les FGFRs sont également exprimés dans les néoblastes (= cellules souches pluripotentes) des planaires. D'ailleurs, la signalisation FGFR est également impliquée dans le contrôle du devenir de ces cellules souches.

Chez *S. mansoni*, deux récepteurs au FGF ont été identifiés : SmFGFR-A et SmFGFR-B. Les transcrits des deux récepteurs sont localisés dans les gonades des parasites adultes et sur-régulés dans l'ovaire des femelles après appariement. SmFGFR-B est aussi détecté au niveau du vitellarium des femelles, du parenchyme et du gastroderme des deux sexes (Hahnel et al., 2014). SmFGFR-A est également localisé dans le parenchyme, notamment au niveau des cellules souches somatiques du parasite (Collins et al., 2013).

L'inhibition des SmFGFRs par un inhibiteur (BIBF1120) induit le désappariement des couples, un gonflement du tube digestif, l'incurvation des vers, une diminution de la ponte puis la mort des parasites. L'observation des parasites en microscopie confocale met en évidence un rétrécissement des lobes testiculaires et une faible abondance de spermatozoïdes matures chez les mâles, tandis que les ovaires des femelles contiennent des ovocytes dégénérés (Hahnel et al., 2014). L'interférence de SmFGFR-A ainsi que le traitement des parasites par le BIBF1120 induisent une diminution de l'activité mitotique des cellules, notamment au niveau du parenchyme, des testicules et du vitellarium (Collins et al., 2013; Hahnel et al., 2014). L'interférence de *SmFGFR-A* entraîne également une sous-régulation de l'expression de gènes associés au cycle cellulaire et des marqueurs des cellules souches somatiques (Collins et al., 2013). SmFGFR-A serait donc impliqué dans la reproduction ainsi que dans la régulation et la maintenance des cellules souches somatiques du parasite adulte (Collins et al., 2013; Hahnel et al., 2014).

Chez le sporocyste, SmFGFR-A semble exprimé dans les cellules germinales. De la même façon que chez l'adulte, l'interférence du récepteur entraîne une sous-régulation des gènes associés au cycle cellulaire et inhibe la prolifération des cellules germinales. L'ensemble de ces résultats indiquent que la signalisation par SmFGFR-A pourrait contrôler la prolifération des cellules souches à la fois chez le sporocyste et chez l'adulte (Wang et al., 2013).

Le rôle de ces différents RTKs dans la reproduction du parasite ainsi que leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques pour lutter contre la schistosomiase ont fait l'objet d'une revue « Receptor tyrosine kinase and schistosome reproduction : new targets for chemotherapy » publiée dans *Frontiers in Genetics* en juillet 2014, et que je présente dans la première partie des résultats de ce mémoire.

IV. Les Récepteurs Venus Kinase (VKRs)

A. Découverte d'un RTK atypique : SmVKR1

SmVKR1 (anciennement SmRTK1) a été découvert fortuitement au laboratoire lors des essais de clonage des récepteurs à l'insuline de *S. mansoni* au moyen d'amorces ciblant les parties conservées des domaines TK des IRs. Cette stratégie a conduit à l'amplification d'un ADNc de 6022 pb codant pour une protéine de 1559 acides aminés contenant un domaine TK fortement identique à celui des membres de la famille des IRs. Comme tous les RTKs, la protéine possédait un seul domaine transmembranaire et une partie extracellulaire quant à elle très divergente de celle des IRs. Son analyse structurale a mis en évidence la présence d'un domaine de fixation du ligand de type Venus FlyTrap (VFT) [Figure 41] (Vicogne et al., 2003).

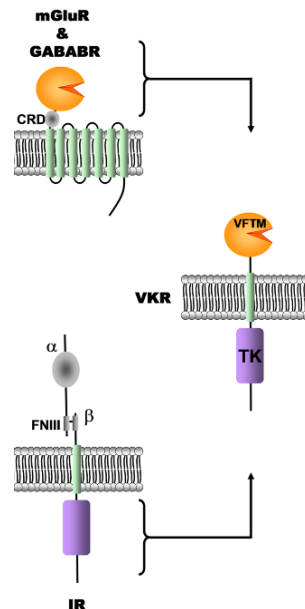


Figure 41 : Structure d'un VKR. Les VKRs sont constitués d'un domaine tyrosine kinase (TK) intracellulaire, similaire à ceux des récepteurs à l'insuline (IR), d'un domaine transmembranaire, et d'un module Venus FlyTrap (VFTM), similaire à ceux des récepteurs couplés aux protéines G de classe C (Récepteurs au Glutamate mGluR ou Récepteurs au GABA, GABA_BR par exemple). (Ahier et al., 2009)

Les domaines VFT sont composés de deux lobes connectés par des séquences flexibles qui permettent la fermeture de la structure lors de la fixation du ligand. Leur fonctionnement est semblable à celui de la plante carnivore Venus Flytrap, *Dionaea muscipula*, qui referme ses feuilles lorsque sa proie s'y pose. Les VFTs sont retrouvés dans les protéines périplasmiques bactériennes (PBP) ainsi que dans les récepteurs couplés aux protéines G de classe C dont font partie les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR), les récepteurs au GABA (γ -amino butyric acid) de type B (GABA_BR) ou les

récepteurs senseurs de calcium. L'ensemble des récepteurs présentant un VFT fixe de petits ligands tels que des acides aminés, des ions, des oses, des phéromones ou des petits peptides (Pin et al., 2003). L'association d'un domaine TK avec un domaine VFT n'ayant jamais été décrite auparavant, le laboratoire s'est investi dans la caractérisation structurale et fonctionnelle de ce récepteur atypique. Les études *in silico* du domaine TK de SmVKR1 ont permis de mettre en évidence la conservation des motifs essentiels à son activité catalytique, laissant ainsi supposer une fonction de SmVKR1 dans la biologie du parasite. Les transcrits de SmVKR1 sont présents à tous les stades du parasite. Ils sont principalement localisés dans le parenchyme des parasites mâles, dans l'ovaire et l'oviducte des femelles et dans les cellules entourant la masse neurale chez les miracidia et les sporocystes [Figure 42]. L'expression de la protéine a ensuite été démontrée par l'analyse en western blot de préparations de membranes de parasites adultes et de sporocystes. Sa masse moléculaire apparente était de 250 KDa, bien supérieure à la masse prédite de 172 KDa, suggérant une glycosylation de SmVKR1, comme pour la plupart des récepteurs transmembranaires (Vicogne et al., 2003).

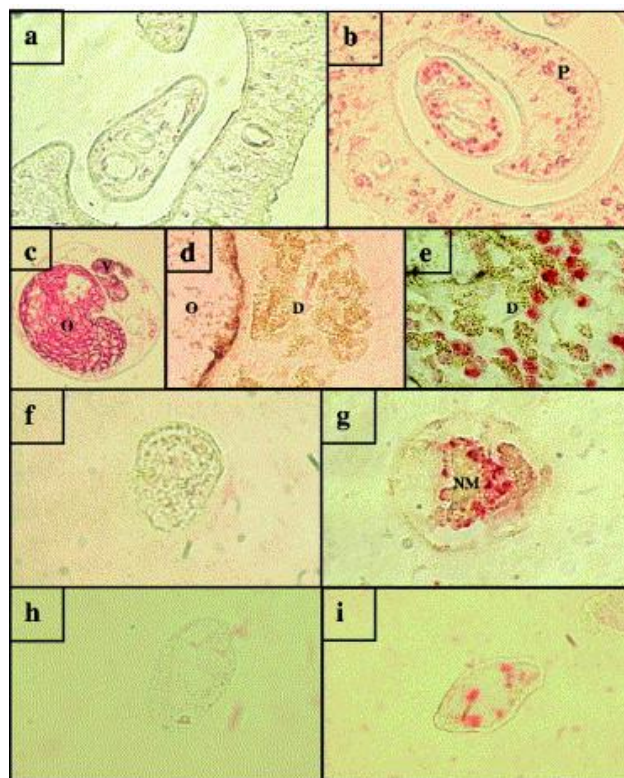


Figure 42 : Localisation des transcrits de SmVKR1. Hybridation *in situ* sur des coupes de parasites mâles (a, b) et femelles (c, d, e), de miracidia (f, g) et de sporocystes (h, i). a, d, h : contrôles négatifs utilisant des sondes sens dirigées contre SmVKR1. (P : parenchyme, O : ovaire, D : oviducte, NM : masse neurale) (Vicogne et al., 2003)

B. La famille des VKRs

1. Analyse phylogénétique

Au fur et à mesure de la publication de nouvelles données génomiques, différents récepteurs présentant la même structure que SmVKR1 ont été identifiés chez d'autres espèces d'invertébrés faisant des VKRs une famille de RTKs à part entière (Ahier et al., 2009; Vanderstraete et al., 2013a Annexe1). En effet, les VKRs forment un groupe monophylétique et ont été détectés chez diverses espèces appartenant aux phyla des arthropodes, des mollusques, des annélides, des échinodermes, des cnidaires et des plathelminthes. Parmi ces espèces, certaines possèdent deux gènes codant pour des récepteurs VKRs différents. C'est d'ailleurs le cas de *S. mansoni* mais également celui d'un autre trématode parasite *Clonorchis sinensis*. Les lépidoptères *Bombyx mori* et *Danaus plexipus* présentent également deux gènes *vk*r positionnés en tandem au sein d'un même « scaffold » [Figure 43] (Vanderstraete et al., 2013a Annexe 1).

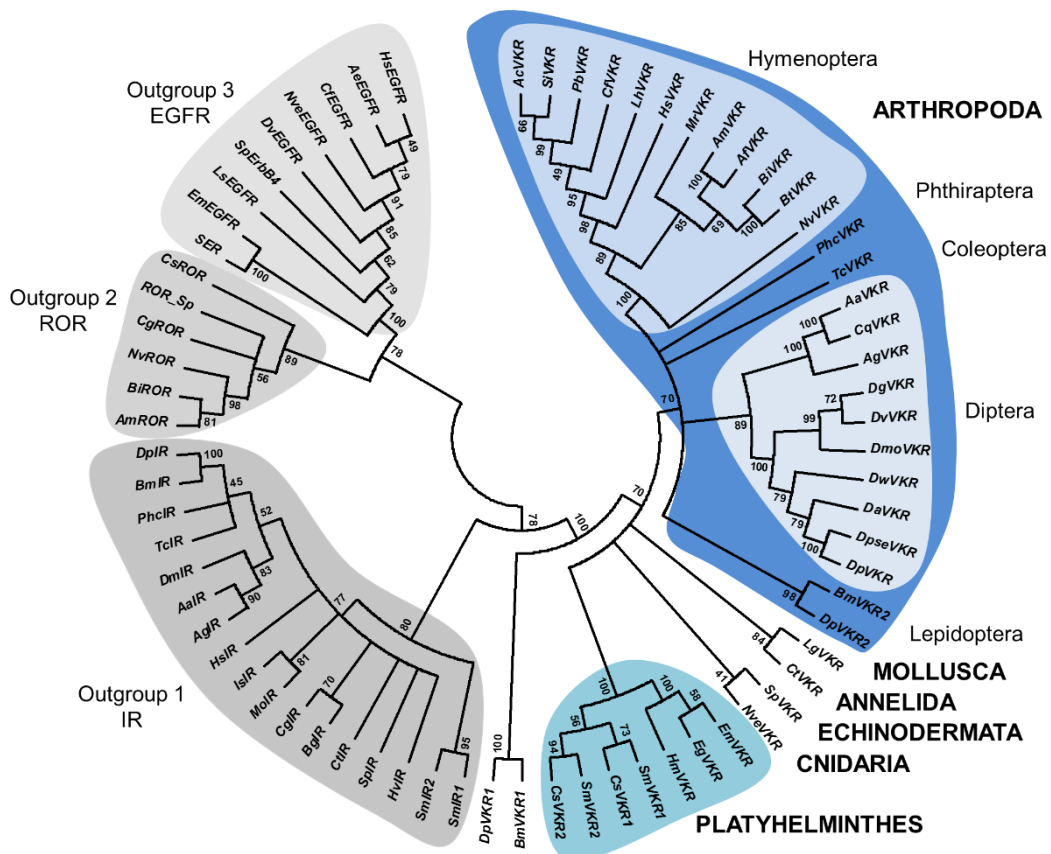


Figure 43 : Arbre phylogénétique de la famille des VKRs généré par la méthode du maximum de vraisemblance. Divers membres des familles des IRs, des EGFRs et des ROR ont été utilisés pour la constitution des « outgroups » (Vanderstraete et al., 2013a Annexe 1).

L'analyse de la structure intron-exon des différents gènes *vkr* a mis en évidence une forte variabilité de taille et de complexité entre les différentes espèces. Ils possèdent toutefois des caractéristiques communes, conservées entre les différents phyla.

Bien que présent chez certaines drosophiles, aucun gène *vkr* n'a été détecté dans le génome de *Drosophila melanogaster*. De la même façon, les VKRs semblent être absents du phylum des nématodes et donc de *Caenorhabditis elegans*. L'absence de VKR dans ces deux principaux modèles d'étude invertébrés explique certainement pourquoi cette association entre un VFT et un domaine TK n'avait jamais été décrite auparavant. De la même façon, aucun gène codant pour un VKR n'a été détecté dans un génome de vertébré.

Des analyses phylogénétiques séparées des domaines intracellulaires et extracellulaires des VKRs ont permis de confirmer les résultats préalablement obtenus par l'étude *in silico* de SmVKR1 (Vicogne et al., 2003) : les VFTs des différents VKRs ressemblent aux VFTs des récepteurs couplés aux protéines G de classe C GABA_BR [Figure 44A] tandis que les domaines TK des VKRs sont proches de ceux des récepteurs à l'insuline [Figure 44B] (Ahier et al., 2009).

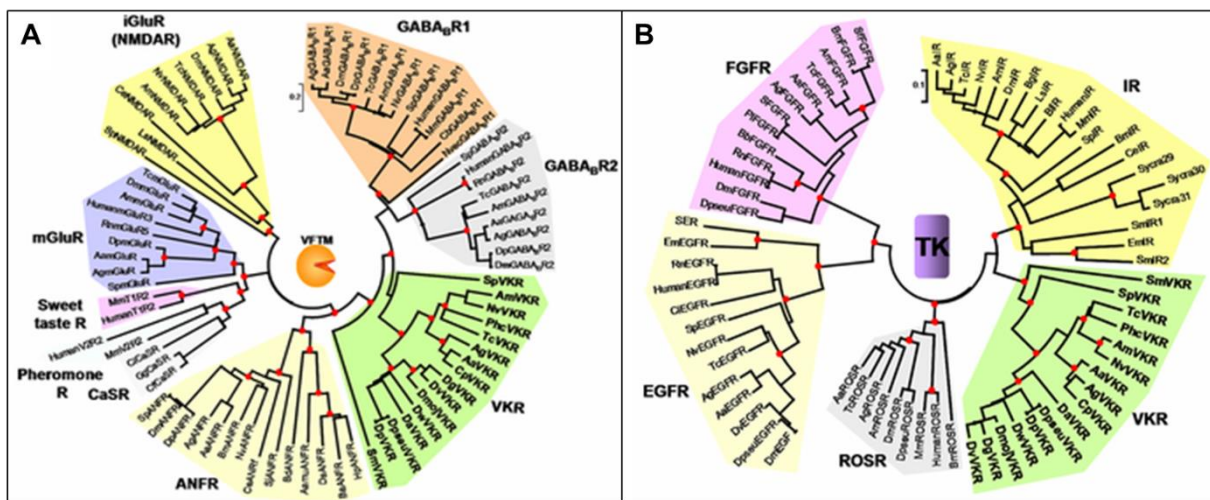


Figure 44 : Analyse phylogénétique des différents domaines des VKRs. A : Relations phylogénétiques entre les domaines VFT des VKRs et ceux d'autres récepteurs : les récepteurs au GABA_B (GABA_BR1 et GABA_BR2), les récepteurs à l'Atrial Natriuretic Factor (ANFR), les récepteurs métabotropiques (mGluR, Sweet-taste, phéromone et les Calcium-sensing Receptor (CaSR)) et les récepteurs ionotropiques au glutamate (iGluR). B : Relations phylogénétiques entre les domaines TK des VKRs et ceux d'autres RTKs : les EGFR, les FGFR, les IR et les ROSR. (Ahier et al., 2009)

2. Expression et activité des VKRs

Le clonage de *vkrs* de différentes espèces (le moustique *Anopheles gambiae*, l'abeille *Apis mellifera*, le ver de farine *Tribolium castaneum* et l'oursin *Strongylocentrus purpuratus*) a permis de confirmer leur expression dans les différents organismes (Ahier et al., 2009).

Des expériences de PCR quantitative ont démontré une plus forte expression des *vkrs* chez les larves (*T. castaneum* et *A. mellifera*) et dans les gonades des adultes (*S. purpuratus* et *A. gambiae*). Ces résultats, en supplément de ceux préalablement obtenus lors de l'analyse des transcrits de SmVKR1 indiquent un rôle possible des VKRs dans le développement larvaire et dans la reproduction d'organismes invertébrés (Ahier et al., 2009; Vicogne et al., 2003).

Les VKRs possèdent des caractéristiques spécifiques des RTKs. En effet, l'expression en cellules HEK du VKR d'*A. mellifera*, AmVKR, a permis de confirmer la capacité du VKR à s'autophosphoryler. En parallèle, des expériences de FRET ont montré que les récepteurs forment des homodimères à la surface des cellules.

L'analyse du modèle tridimensionnel du VFT d'AmVKR et sa comparaison avec la structure du VFT de mGluR1 a mis en évidence la conservation de résidus impliqués dans la liaison des acides aminés, notamment de la Ser165 qui fixe l'acide carboxylique du glutamate. Cependant, la non-conservation de certains résidus indique qu'AmVKR serait incapable de lier le glutamate mais pourrait tout de même lier un (des) autre(s) acide(s) aminé(s). Un test kinase a permis de démontrer que l'ajout de L-Arginine (L-Arg) induisait l'autophosphorylation du récepteur (Ahier et al., 2009).

Plus récemment, il a été montré que le VKR du moustique *Aedes aegypti* AaeVKR est capable de lier l'OEH (Ovary Ecdysteroidogenic Hormone), un neuropeptide appartenant à la famille des neuroparsines. Les neuroparsines ne sont connues que chez les arthropodes et sont capables de moduler leur signalisation insuline indépendamment des IRs. Au cours de cette étude, les auteurs ont mis en évidence la présence de la protéine ainsi qu'une abondance des transcrits au niveau des ovaires d'*A. aegypti*. L'expression d'AaeVKR en cellules S2 (cellules de drosophiles) a permis de démontrer que l'interaction de l'OEH avec les dimères d'AaeVKR induit la phosphorylation d'Akt. En parallèle, des expériences d'interférence d'AaeVKR de moustiques femelles ont mis en évidence un rôle d'AaeVKR, dépendant de l'OEH, dans la formation des œufs (Vogel et al., 2015).

De façon intéressante, l'absence à la fois de neuroparsine et de VKR dans le génome de *D. melanogaster* laisse penser que les VKRs pourraient être considérés comme les récepteurs des neuroparsines chez les arthropodes (Dissous, 2015; Vogel et al., 2015).

C. Les VKRs de *S. mansoni*

1. SmVKR1 et SmVKR2 : deux VKRs distincts

S. mansoni possède deux VKRs : SmVKR1 et SmVKR2. Les deux protéines présentent une identité globale de 40% avec une identité plus forte au niveau des domaines VFT (48%) et des domaines TK (71%).

Les différences observées au niveau du VFT indiquent que les deux récepteurs pourraient avoir des ligands différents. L'expression des protéines en ovocyte de xénope a ainsi permis de mettre en évidence l'activation de SmVKR1 par la L-Arg tandis que SmVKR2 est activé par les ions Calcium Ca^{++} présents dans le milieu de culture des ovocytes (Gouignard et al., 2012).

Des études complémentaires, toujours dans le modèle d'ovocyte de xénope, ont permis de montrer qu'une concentration de 1 μ M de L-Arg était suffisante à la phosphorylation de SmVKR1. En revanche, lors de la mutation du résidu équivalent à la Ser165 de mGluR1 dans SmVKR1 (Ser466), une concentration en L-Arg 1000 fois supérieure (1mM) est nécessaire à l'activation du récepteur.

SmVKR2 est quant à lui phosphorylé en présence d'1mM de Ca^{++} mais il peut également être activé par 1mM de L-Arg. La mutation de l'équivalent de la Ser165 de SmVKR2 (Ser410) empêche totalement l'activation du récepteur par la L-Arg.

Ces résultats confirment l'importance de la Ser165 pour la liaison des acides aminés dans le VFT. D'autres études sont nécessaires afin de définir l'ensemble des résidus impliqués dans la liaison de la L-Arg à SmVKR1 (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}).

Comme cela avait été montré pour AmVKR (Ahier et al., 2009), SmVKR1 et SmVKR2 sont capables de former des homodimères. De façon intéressante, les deux récepteurs sont également capables de s'hétérodimériser. Dans le cas de SmVKR2, la dimérisation et l'activation du récepteur ne se font qu'en présence de Ca^{++} . De façon inattendue, la dimérisation de SmVKR1 quant à elle, peut se faire à la fois en présence de L-Arg, mais également en présence de Ca^{++} . L'activation des dimères de VKR1 n'est cependant possible qu'en présence de L-Arg. Enfin, la formation d'hétérodimères SmVKR1/SmVKR2 ainsi que leur activation ne peut se faire qu'en présence des deux ligands : Ca^{++} et L-Arg (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}).

2. Rôle des SmVKRs dans la reproduction du parasite

SmVKR1 et SmVKR2 sont exprimés à tous les stades parasitaires et d'une manière générale, les transcrits de *Smvkr2* sont plus abondants que ceux de *Smvkr1* (Gouignard et al., 2012). De plus, les SmVKRs sont tous deux plus abondants chez les vers femelles que chez les mâles. L'hybridation *in situ*

des deux récepteurs a mis en évidence une expression abondante de *Smvkr1* au niveau des ovocytes matures, tandis que *Smvkr2* est plus exprimé au niveau des ovocytes immatures. *Smvkr1* et *Smvkr2* sont tous deux exprimés également autour de l'ootype chez la femelle, dans le parenchyme du mâle et beaucoup plus faiblement, au niveau des testicules [Figure 45] (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe2}).

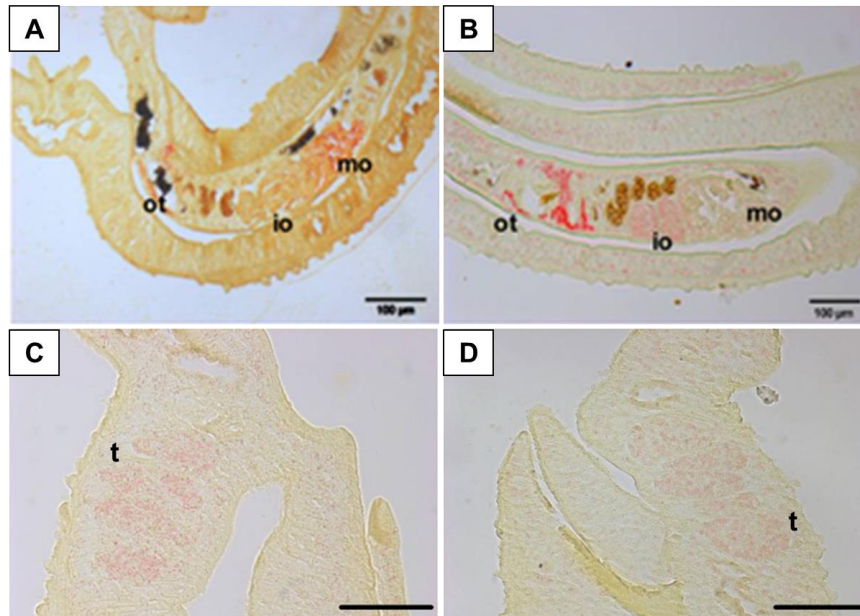


Figure 45 : Localisation des transcrits des SmVKRs par hybridation *in situ*. A, C : localisation de SmVKR1 ; B, D : localisation de SmVKR2. SmVKR1 est plus exprimé au niveau des ovocytes matures et autour de l'ootype (A) tandis que SmVKR2 est plutôt exprimé au niveau des ovocytes immatures et dans la région de l'ootype (B). Les deux récepteurs sont exprimés, beaucoup plus faiblement, dans les testicules des mâles (C, D). (ot : ootype, io : ovocyte immature, om : ovocyte mature, t : testicule ; échelles : A, B : 50 µm, C, D : 100 µm)

Des couples de parasites adultes ont été interférés pour *SmVKR1*, *SmVKR2* ainsi que pour les deux récepteurs simultanément. Après 5 jours d'interférence, l'observation des vers en microscopie confocale a mis en évidence un effet de l'inhibition de la traduction de l'un et/ou de l'autre récepteur sur les organes reproducteurs des parasites. En effet, la diminution de *Smvkr1* induit une désorganisation de l'ovaire avec une majorité d'ovocytes matures. L'interférence de *Smvkr2* conduit à ce même phénotype, associé à une réduction de la taille de l'ovaire. Lorsque les deux gènes sont ciblés, ces différents phénotypes s'additionnent. En plus, l'interférence de *Smvkr1* conduit à une malformation des œufs. Chez les mâles, aucun phénotype marqué n'est visible lors de l'interférence d'un des deux gènes. En revanche, lors de la double interférence, les lobes testiculaires semblent plus petits et contiennent peu de cellules, et les vésicules séminales apparaissent vides [Figure 46] (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}).

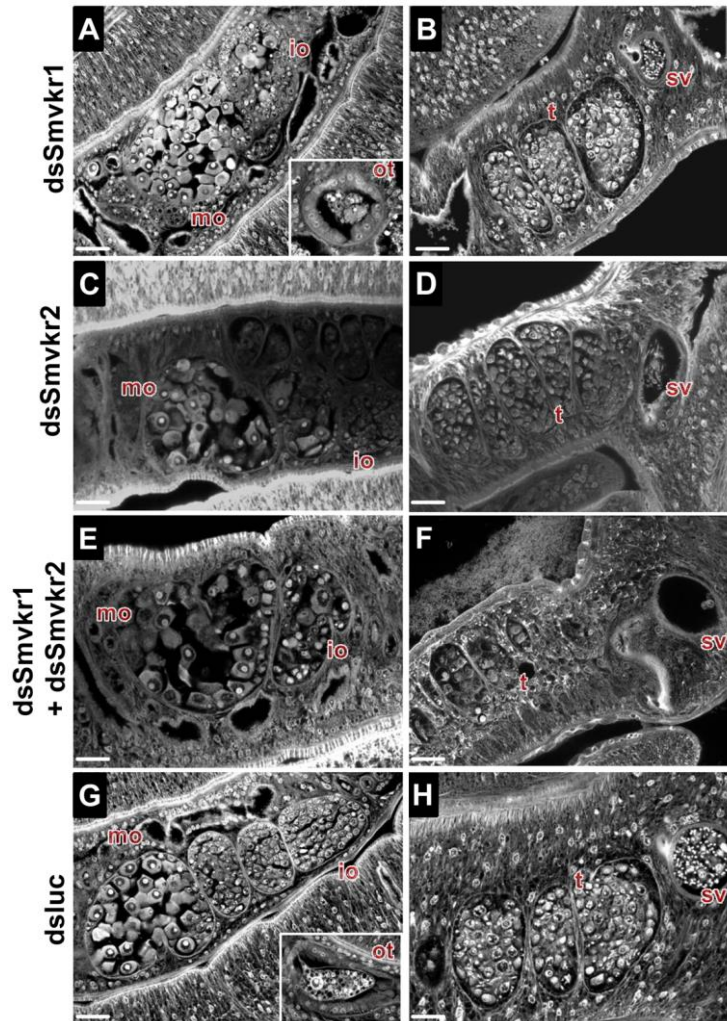


Figure 46 : Impact de l'interférence de SmVKR1 et/ou SmVKR2 sur les organes reproducteurs de *S. mansoni*. Les parasites sont observés en microscopie confocale à balayage laser après 5 jours d'interférence avec des ARNs double brin (dsRNA) dirigés contre (A, B) *Smvkr1*, (C, D) *Smvkr2*, (E, F) *Smvkr1* et *Smvkr2* ou (G, H) *Luc* (dsRNA non relevant dirigés contre la Luciférase). (mo : ovocyte mature, io : ovocyte immature, ot : ootype, t : testicule, sv : vésicule séminale ; échelle : 20 μ m)

Ensemble, ces résultats mettent en évidence l'importance des VKRs dans les mécanismes de reproduction de *S. mansoni*. SmVKR1 et SmVKR2 semblent jouer un rôle essentiel dans la gamétogenèse, notamment l'oogenèse et pourraient être impliqués dans la formation des œufs (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}).

3. Voies de signalisation associées aux SmVKRs

Lors du séquençage de SmVKR1 et SmVKR2, les différences observées au niveau de leurs domaines intracellulaires laissaient déjà supposer que les récepteurs pouvaient interagir avec des protéines différentes (Gouignard et al., 2012).

Cela a été confirmé par l'étude des voies de signalisation induites lors de l'activation des SmVKRs dans le modèle de l'ovocyte de xénope. En effet, alors que SmVKR1 et SmVKR2 actifs sont capables d'induire les voies Akt/S6K et ERK2, seul SmVKR1 conduit à la phosphorylation de JNK (Dissous et al., 2014^{Annexe 3}).

En parallèle, la recherche de partenaires de SmVKR1 et SmVKR2 en criblant une banque d'ADNc de schistosomes adultes avec l'un ou l'autre de leurs domaines intracellulaires par la technique du double hybride en levure, a permis respectivement l'identification de 44 et de 10 protéines partenaires pour SmVKR1 et SmVKR2.

Parmi les protéines potentiellement impliquées dans la signalisation cellulaire de SmVKR2, la protéine Cbl, une E3 ubiquitin-protein ligase, a été identifiée (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}). En plus de leurs domaines d'ubiquitylation, les protéines Cbl possèdent des domaines caractéristiques des protéines adaptatrices : un domaine de liaison aux TK et un motif riche en proline, qui permet l'interaction protéine-protéine. De ce fait, les Cbl sont impliquées dans la signalisation de différents RTKs (Thien et Langdon, 2001).

Concernant SmVKR1, en accord avec l'activation spécifique de la voie JNK induite par le récepteur, deux protéines impliquées dans cette voie de signalisation ont été identifiées : SmMKK7 et SmPP2C. En effet, MKK7 est une MAPKK responsable de la phosphorylation de JNK tandis que les phosphatases PP2C sont impliquées dans la régulation des composants des voies activées par le stress p38 et JNK.

Enfin, une protéine présentant un domaine SH2, de la famille des Shb, a également été identifiée comme partenaire de SmVKR1 (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}). Compte tenu du rôle essentiel des protéines Shb dans la signalisation de nombreux RTKs (Welsh et al., 2016), la caractérisation de cette protéine Shb-like a fait l'objet de la majeure partie de mon travail de thèse. Les résultats obtenus seront décrits dans la troisième partie des résultats.

V. Projet de thèse

Les études menées au laboratoire portent sur les protéines kinases qui régulent les mécanismes de reproduction du parasite, et en conséquence l'efficacité de sa transmission et son pouvoir pathogène. Du fait de leur rôle central dans la transmission des signaux, les RTKs représentent des acteurs majeurs des voies kinases. Depuis ces dernières années, de nombreux travaux ont démontré l'importance des kinases dans la fécondité des schistosomes. Inscrit dans ce contexte, mon travail de thèse a été structuré en trois parties :

Dans la première partie, le potentiel des RTKs impliqués dans la reproduction du schistosome en tant que cibles thérapeutiques sera exposé sous la forme d'une revue. Cette revue relate les résultats obtenus lors de l'inhibition des RTKs du parasite par des inhibiteurs commerciaux *in vitro*. Notamment l'inhibition simultanée des SmVKRs et des IRs par la tyrphostine AG1024 et son effet délétère sur le schistosome seront présentés.

La seconde partie sera consacrée à l'identification de la voie de signalisation Akt comme cible pour lutter contre la schistosomiase. Cette étude découle du criblage d'un grand nombre d'inhibiteurs de kinases qui a permis 1) de confirmer certaines études précédentes mettant en évidence le rôle de protéines kinases dans la reproduction ou la fécondité du parasite et 2) de mettre en évidence l'effet toxique impressionnant de certains inhibiteurs d'Akt aussi bien sur l'appariement des parasites que sur la viabilité des schistosomules.

Enfin, la dernière partie portera sur la caractérisation de SmShb, un partenaire spécifique de SmVKR1, et de son rôle dans la régulation de la signalisation induite par SmVKR1.

RÉSULTATS

I. Les RTKs dans la reproduction du schistosome : de nouvelles cibles thérapeutiques

La schistosomiase représente toujours la seconde endémie parasitaire mondiale engendrant ainsi un problème de santé publique et des difficultés économiques majeures dans les pays en développement. Afin de parer à l'apparition de résistances au seul traitement efficace et utilisé en masse à ce jour, le PZQ, des efforts ont été déployés afin de mieux comprendre comment se développent les organes reproducteurs des vers femelles. Ces études ont pour but définir de nouvelles stratégies de lutte contre la schistosomiase en régulant la ponte du parasite. En raison de leurs fonctions essentielles dans la biologie et notamment dans la reproduction des schistosomes, les protéines kinases sont apparues comme des cibles thérapeutiques de choix.

Dans ce contexte, la revue intitulée « Receptor tyrosine kinases and schistosome reproduction : new targets for chemotherapy » expose différentes données acquises ces dernières années concernant le rôle des voies kinases dans la régulation de la maturation sexuelle et dans la formation des œufs des schistosomes. Plus particulièrement, les fonctions des RTKs du parasite dans la reproduction ainsi que les conséquences de leur inhibition sur la reproduction du schistosome sont mises en avant.

Après avoir exposé l'importance de la signalisation kinase dans la reproduction du parasite, nous avons décrit les différents RTKs du schistosome, dont SER, SmIR1, SmIR2, SmFGFR-A, SmFGFR-B, SmVKR1 et SmVKR2, ainsi que leurs fonctions dans les mécanismes de reproduction. Enfin, la dernière partie de la revue porte sur l'inhibition des RTKs, notamment sur l'inhibition simultanée des SmIRs et des SmVKRs par la tyrphostin (TYRosine PHOSphorylation INhibitor) AG1024.

En effet, lors de ma thèse j'ai participé au travail de recherche publié dans PLoS Neglected Tropical Diseases (Vanderstraete *et al.*, 2013b^{Annexe 4}), dans lequel nous avons montré la capacité de l'AG1024 à inhiber, à une concentration très faible (1 μ M), l'activité kinase des SmIRs, des SmVKRs et de SER recombinants. L'utilisation de ce composé sur des parasites en culture a démontré son effet schistosomicide à la fois sur les schistosomules et sur les parasites adultes. De plus, le traitement de couples de parasites adultes avec des doses sub-létales d'AG1024 entraînait un désappariement des vers et une forte diminution de la ponte. L'analyse phénotypique des organes reproducteurs des couples traités par microscopie confocale, avait mis en évidence une diminution de la taille de l'ovaire associée à une désorganisation des ovocytes avec présence d'une majorité d'ovocytes matures chez les vers femelles. Chez les vers mâles, nous avons observé une absence de spermatozoïdes matures

dans la vésicule séminale, remplacés par des cellules immatures. Enfin, le traitement des parasites adultes entraînait également une malformation des œufs voire une inhibition totale de leur formation.

La conservation des domaines catalytiques des RTKs de schistosomes est illustrée dans la figure 2 de la revue. En effet, l'analyse des différentes séquences avec le serveur Consurf (<http://consurf.tau.ac.il>) a permis de mettre en évidence une forte conservation des résidus entre les différents domaines kinase, notamment au niveau de la boucle catalytique et du site de fixation de l'ATP. Cette homologie entre les différents RTKs est certainement une des raisons pour laquelle l'AG1024 est capable d'inhiber simultanément l'activité des SmIRs, des SmVKRs et de SER.

Ensemble, ces données ont démontré un rôle majeur des RTKs dans la gamétogenèse ainsi que la possibilité d'affecter la reproduction de *S. mansoni* en définissant des inhibiteurs pouvant agir simultanément sur les différents RTKs du parasite.

Du fait de leur rôle potentiel dans la reproduction du parasite mais également de leur absence chez l'Homme, les VKRs apparaissent comme des cibles thérapeutiques de choix pour lutter contre la schistosomiase.

Comme mentionné à la fin de la revue, une solution alternative pour inhiber les VKRs pourrait être l'utilisation de petits ligands antagonistes pouvant se lier dans le VFT et inhiber spécifiquement l'activation des VKRs. Dans ce sens, lors de l'identification des ligands des SmVKRs, nous avons montré que des dérivés de la L-Arg, qu'ils soient dépourvus du groupement guanidine (Ornithine), de la fonction α -amino acid (Créatine, Agmatine) ou qu'ils soient analogues à la L-Arg (D-Arg, L-Canavanine), entraient tous en compétition avec la L-Arg et inhibaient l'activation de SmVKR1. De plus, l'ajout de L-Canavanine sur des vers adultes en culture entraînait une déstructuration des ovaires, similaire au phénotype observé lors de l'interférence de *Smvkr1*. Ainsi, une meilleure connaissance de la structure du VFT de SmVKR1 pourrait permettre de définir des ligands antagonistes spécifiques (Vanderstraete *et al.*, 2014^{Annexe 2}).

Cette revue a été publiée dans le journal *Frontiers in Genetics* en juillet 2014.
<http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00238>

Receptor tyrosine kinases and schistosome reproduction: new targets for chemotherapy

Marion Morel¹, Mathieu Vanderstraete¹, Steffen Hahnel², Christoph G. Grevelding² and Colette Dissous^{1*}

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- BFS, Institute of Parasitology, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany

Correspondence:

Dr. Colette Dissous
Center for Infection and Immunity of Lille
INSERM U1019, CNRS-UMR 8204
Institut Pasteur de Lille
University Lille Nord de France
1 rue du Professeur Calmette
59019 Lille Cedex, France
e-mail : colette.dissous@pasteur-lille.fr

Running title: Schistosome Receptor Tyrosine Kinases

Keywords: Schistosome, Receptor Tyrosine Kinase, Signaling, Reproduction, Chemotherapy

Abstract

Schistosome parasites still represent a serious public health concern and a major economic problem in developing countries. Pathology of schistosomiasis is mainly due to massive egg production by these parasites and to inflammatory responses raised against the eggs which are trapped in host tissues. Tyrosine kinases (TKs) are key molecules that control cell differentiation and proliferation and they already represent important targets in cancer therapy. During recent years, it has been shown that receptor tyrosine kinases (RTK) signaling was active in reproductive organs and that it could regulate sexual maturation of schistosomes and egg production. This opens interesting perspectives for the control of transmission and pathogenesis of schistosomiasis based on new therapies targeting schistosome RTKs. This review relates the numerous data showing the major roles of kinase signaling in schistosome reproduction. It describes the conserved and particular features of schistosome RTKs, their implication in gametogenesis and reproduction processes and summarizes recent works indicating that RTKs and their signaling partners are interesting chemotherapeutical targets in new programs of control.

Schistosomes, kinase signaling and reproduction

Schistosomiasis, or bilharzia, is a parasitic disease with outstanding medical and economic importance, caused by trematodes of the *Schistosoma* genus (Chitsulo et al., 2004). *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum* are the three major infective species in humans. Whereas most of the trematodes are hermaphrodites, schistosomes have separate sexes, and the sexual maturation of female worms is dependent on constant pairing with males (Popiel and Basch, 1984; Kunz, 2001; LoVerde and Chen, 1991). Pairing induces mitosis and maintains differentiation of stem cell-like precursor cells in the ovary and vitellarium (Kunz, 2001; Erasmus, 1973; Den Hollander and Erasmus, 1985; Galanti et al., 2012). These processes are a prerequisite for the production of eggs, formed by one oocyte and 30-40 vitelline cells combined within the ootype to form viable eggs. The control of this major parasitic disease currently relies on mass treatment with a single drug, Praziquantel. This drug is efficient against the three human schistosome species, but its widespread use raises fears about resistance and motivates the search for alternative therapies (Doenhoff et al., 2008; Melman et al., 2009). During recent years, much effort has been made to understand the development of female reproductive organs with the aim to find strategies to reduce transmission and morbidity of schistosomiasis by preventing egg production (LoVerde et al., 2009; Beckmann et al., 2010a). Indeed, eggs are responsible for parasite transmission but also for pathogenesis in humans since they accumulate in host tissues, particularly in liver, and elicit granulomatous inflammatory reactions leading to periportal fibrosis, portal hypertension and hepatosplenomegaly (Hoffmann et al., 2002).

Evidence has been obtained that TGF- β pathways play a major role in female reproductive development and egg embryogenesis. Essential components of TGF- β pathways (TbRI and II, R-Smad, Co-Smad, FKBP12) have been identified in schistosomes, and their expression in vitelline cells was demonstrated (Beall et al., 2000; Davies et al., 1998; Knobloch et al., 2004; Osman et al., 2001, 2004, 2006). The TGF- β pathway regulates the synthesis of SmGCP, a gynecophoral canal protein involved in promoting contact between males and females (Osman et al., 2006). The activin ligand of the receptor TbRII, SmInAct, is also crucial for successful embryogenesis in schistosome eggs (Freitas et al., 2007) and the TbRI serine/threonine kinase inhibitor (TRIKI) was shown to reduce vitelline cell mitotic activity and egg production in female worms (Knobloch et al., 2007). Tyrosine kinases (TKs) are also important for female gonad development and in this context, the Src-like cytosolic TK (CTK), SmTK3, seems to play a dominant role in proliferation of vitelline cells (Kapp et al., 2004). Treatment of parasites with the Src inhibitor Herbimycin A significantly blocked male-induced mitotic activity in paired females and interestingly, the combined treatment of paired schistosomes with TRIKI and Herbimycin A was more efficient to reduce mitosis and egg production, indicating possible cross-talk between Src and TGF- β

pathways (Knobloch et al., 2007). Recently, transcriptome analyses of inhibitor-treated schistosomes provided further evidence for a cooperation between Src-kinase and TGF- β pathway in the control of mitosis and eggshell formation (Buro et al., 2013) and for an association of Abl-kinase activities with TGF β signaling (Buro et al., 2014). Finally, the Syk kinase SmTK4 (Syk kinase) (Knobloch et al., 2002) and the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 (Beckmann et al., 2011) presumably act together with SmTK3 in a multi-kinase complex to transduce signals potentially induced by the activation of membrane receptors, such as integrins (Sm β -Int1) or receptor tyrosine kinases (RTKs) and which are important for gametogenesis in parasite gonads (Beckmann et al., 2011, 2012).

Schistosome receptor tyrosine kinases

RTKs play essential roles in embryonic development and in various adult tissues and organs, in which they control fundamental processes, such as cell proliferation and differentiation, cell cycle and survival, migration, and metabolism (Ullrich and Schlessinger, 1990). RTKs form a superfamily of transmembrane proteins present in all metazoans, from sponges to humans (Suga et al., 2012) and they are composed of an extracellular ligand binding region formed by various subdomains, a single transmembrane domain, and an intracellular domain with intrinsic TK activity. Annotation of the *S. mansoni* genome (Berriman et al., 2009; Protasio et al., 2012) and analyses by combined computational approaches have shown that the tyrosine kinome of *S. mansoni* contains 15 RTKs including four members of the EGF-R (epidermal growth factor receptor) family, two of the IR (insulin receptor) family, two FGF-R (fibroblast growth factor receptor) members, one representative of Ephrin-R, ROR and MuSK families, a homolog of CCK4, and one unknown receptor (Andrade et al., 2011; Avelar et al., 2011). Additionally, the schistosome genome encodes two Venus kinase receptors (VKRs), belonging to a novel family of RTKs originally discovered in *S. mansoni* (Vicogne et al., 2003; Dissous et al., 2014a, 2014b).

Over the past few years, five RTKs of *S. mansoni* have been particularly well investigated. SER (*Schistosoma* Epidermal growth factor Receptor) was the first RTK described in *S. mansoni* (Shoemaker et al., 1992). It contains a conserved intracellular TK domain and an extracellular domain for binding of EGF ligands. When expressed in mammalian cells, SER can bind human EGF with the same affinity as human EGF-R (HER) and it activates the classical and conserved Ras/ERK signaling pathway. Human EGF was shown to induce SER autophosphorylation in *S. mansoni* adult worms and to increase protein and DNA synthesis as well as protein phosphorylation in schistosome larvae, indicating for the first time that host hormones were involved in regulating schistosome development (Vicogne et al., 2004). Such a potential dialogue between host ligands and parasite receptors was further confirmed by the ability of human TGF- β to activate TbRI/II schistosome receptors (Beall and Pearce, 2001) but also by

evidence that human insulin can bind to schistosome membrane RTKs to regulate metabolic and glucose uptake activities in the parasite (Khayath et al., 2007; Ahier et al., 2008; You et al., 2010). Two members of the IR family were identified in *S. mansoni* (SmIR1 and SmIR2) (Khayath et al., 2007), then in *S. japonicum* (SjIR1 and SjIR2) (You et al., 2010). Schistosome IR1 and IR2 display differences in the structural motifs essential for signaling and in their expression sites. Schistosome IR1 is expressed in muscles, intestinal epithelial cells and at the basal membrane of the tegument (Khayath et al., 2007), and they are colocalized with SGTP1 and SGTP4, the schistosome glucose transporters involved in glucose uptake (Skelly et al., 1994). Schistosome IR2 is massively expressed in parenchymal cells of adult schistosomes (Khayath et al., 2007; You et al., 2010), and SjIR2 was also localized in vitelline cells (You et al., 2010). A single IR is present in most invertebrate species which regulates both metabolism and growth, while two receptors IR and IGF-1R exist in vertebrates, which are specialized in metabolic and glucose uptake regulation, and in growth control respectively (Kim and Accili, 2002). It was suggested that similarly SmIR1 and SjIR1 could be specialized in sugar uptake and SmIR2 and SjIR2 preferentially involved in growth of schistosomes.

Besides these conventional and conserved RTKs, which are able to respond to host growth factors (EGF, insulin) and to activate conserved signaling pathways, schistosomes were shown to express unconventional RTKs, named VKRs for Venus Kinase Receptors (Vicogne et al., 2003; Ahier et al., 2009). VKRs are composed of an extracellular Venus Flytrap module (VFT), linked through a single transmembrane fragment to an intracellular tyrosine kinase domain similar to that of IRs (Vicogne et al., 2003). VFTs are the extracellular domains of many G-protein coupled receptors of class C, and they are composed of two lobes that close upon the binding of small ligands (amino-acids, ions) similarly to the leaves of the Venus Flytrap carnivorous plant, *Dionaea muscipula*, when it catches its prey (Pin et al., 2003). VKRs are found in a large variety of invertebrates from cnidarians to echinoderms (Ahier et al., 2009; Vanderstraete et al., 2013a), and are highly expressed in larval stages and in gonads, suggesting a role of these proteins in embryonic and larval development as well as in reproduction (Ahier et al., 2009; Vanderstraete et al., 2014). *Vkr* genes are found as single copies in most species but in platyhelminths two different *vkr* copies are present (Gougnard et al., 2012; Vanderstraete et al., 2013a, 2014). Up to now, two VKRs have been found in *S. mansoni* as well as in *S. haematobium* (Young et al., 2012). SmVKR1 and SmVKR2 of *S. mansoni* have been extensively studied. They were shown to be activated by L-arginine and calcium ions respectively (Gougnard et al., 2012) and, as many other RTKs, VKRs dimerize to induce intracellular pathways involved in protein synthesis and cellular growth, like the MAPK and PI3K/Akt/S6K pathways (Vanderstraete et al., 2014; Dissous et al., 2014b).

Among the growth factor receptor panel, EGFR and IR/IGFR have been shown to play essential roles in mammals (Sirotkin, 2011; Schneider and Wolf, 2008) as well as in insects (Parrott et al., 2012;

Graf et al., 1997; Brown et al., 2008) for the control of ovarian functions and reproductive processes. Additionally, the discovery that VKRs were abundantly transcribed in the gonads of many invertebrate species (Ahier et al., 2009), indicated that VKR signaling could also participate in reproductive activities. Further analyses have confirmed that all these RTKs were potentially involved in reproduction processes in schistosomes (Figure 1 A).

Functions of schistosome RTKs in reproduction

Besides the importance of the receptor Ser/Thr (S/T) kinases SmTbRI/II and of TGF- β -dependent pathways in schistosome reproduction processes (LoVerde et al., 2007, 2009), TK signaling is also predominant for schistosome gonad development (Beckmann et al., 2010a, 2010b), and a possible cooperation between STK and TK pathways has been proposed for the control of mitosis and eggshell formation in these parasites (Knobloch et al., 2006; Buro et al., 2013). Moreover, diverse CTKs of *S.mansoni* (SmTK3, SmTK4 and SmTK6) were shown to form complexes susceptible to participate in RTK signaling in gonads (Beckmann et al., 2011).

The EGF receptor SER is transcribed in the vitellarium and ovary of schistosome females together with its potential substrate SmEps8 (Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8) and SmTK3, the CTK that was shown to play a dominant role in proliferation of vitelline cells (Kapp et al., 2004). Since SmEps8 interacts in yeast two-hybrid (Y2H) assays with SmTK3, this might indicate a possible role of SER and EGF pathways in reproductive activities (Beckmann et al., 2010a).

Insulin pathways, and especially the insulin-mediated PI3K pathway, play major roles in reproduction processes in many organisms (Graf et al., 1997; Brown et al., 2008). Moreover, the TOR (target of rapamycin)/S6K (p70 S6 kinase) pathway has been identified as an essential nutrient-sensing tool regulating egg development under the control of insulin in mosquitoes (Arsic and Guerin, 2008). Limited information has been obtained concerning the importance of IR receptors in the development of schistosome gonads, except that vaccination of mice with the purified insulin-binding domain of SjIR2 provoked a retardation of adult *S. japonicum* growth and a substantial decrease of egg maturation and laying in parasitized animals (You et al., 2012). While transcriptome analyses did not highlight an overexpression of IR transcripts neither in *S. mansoni* (Nawaratna et al., 2011) nor in *S. japonicum* (Gobert et al., 2009) gonads, they indicated an overexpression of VKR-like transcripts in ovary and vitelline cells of *S. japonicum* (Gobert et al., 2009). In *S. mansoni*, quantitative-PCR results confirmed that both *Smvkr1* and *Smvkr2* genes were more actively transcribed in female worms than in males (Gougnard et al., 2012). By *in situ* hybridization, *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts were detected in testes but they were more abundant in ovaries, in which the expression profile of each *vkr* was noticeably different. *Smvkr1* transcripts were present mainly in the posterior part of the ovary that

contains mature oocytes (in prophase I of meiosis) whereas *Smvkr2* transcripts were found in the anterior part of the organ containing immature oocytes. Q-PCR data obtained from isolated ovaries (Hahnel et al., 2013) indicated that both *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts were up-regulated strongly in the ovaries of sexually-developed females as compared to the organs from virgin females issued from unisexual infections. Additionally, two RTKs of the FGFR family, SmFGFR-A and SmFGFR-B were found among the genes identified as up-regulated in female gonads after pairing (Hahnel et al., 2014, this issue). Analyses of isolated testes confirmed the presence of *Smvkr1* and *Smvkr2* transcripts in male reproductive organs and showed similarly their up-regulation in testes from males issued from bisexual infections (Vanderstraete et al., 2014). This indicated the particular importance of SmVKR receptors during the development and maturation of schistosome reproductive organs.

Recently, molecular partners of SmVKRs have been identified from Y2H screening of an adult *S. mansoni* cDNA library with active intracellular domains of VKRs as baits. The analyses of the resulting partners indicated similarities between VKR and IR pathways, which is in agreement with the identities already observed within the intracellular domains of these RTKs. All the assumptions made from the nature of these partners about the specificity of phospho-pathways elicited by VKR, were supported by further studies of VKR activation and signaling in *Xenopus* oocytes. It was shown that ligand-activated VKRs induced, similarly to the endogenous insulin-activated *Xenopus* IR, the phosphorylation of Erk1/2, Akt and p70S6K (Vanderstraete et al., 2014). This indicated that VKRs were able to stimulate protein synthesis and cellular growth, as IRs do. The JNK pathway was activated by SmVKR1 but not by SmVKR2, corroborating Y2H screening results which showed a specific interaction of SmVKR1 with Rho1, Mek7 and PP2C (Vanderstraete et al., 2014). Since the JNK pathway has been shown to play a major role in oogenesis and meiosis resumption in *C. elegans* (Smith et al., 2002), in *D. melanogaster* (Sackton et al., 2007) and in mammals (Huang et al., 2011; Chuderland et al., 2012), it was postulated that it could be used as a pathway by SmVKR1 to influence oocyte maturation. Furthermore the implication of schistosome VKRs in oogenesis and spermatogenesis was demonstrated by RNA interference. SmVKR silencing led to an important disorganization of the antero-posterior structure of the ovary and the knock down of *Smvkr1* resulted in the accumulation of big oocytes in the ovary and the absence of egg formation (Figure 1 B). In male testes, silencing of both *Smvkr* provoked a decrease of cell density within testicular lobes and paucity of sperm, confirming the potential importance of VKRs in reproduction processes (Vanderstraete et al., 2014).

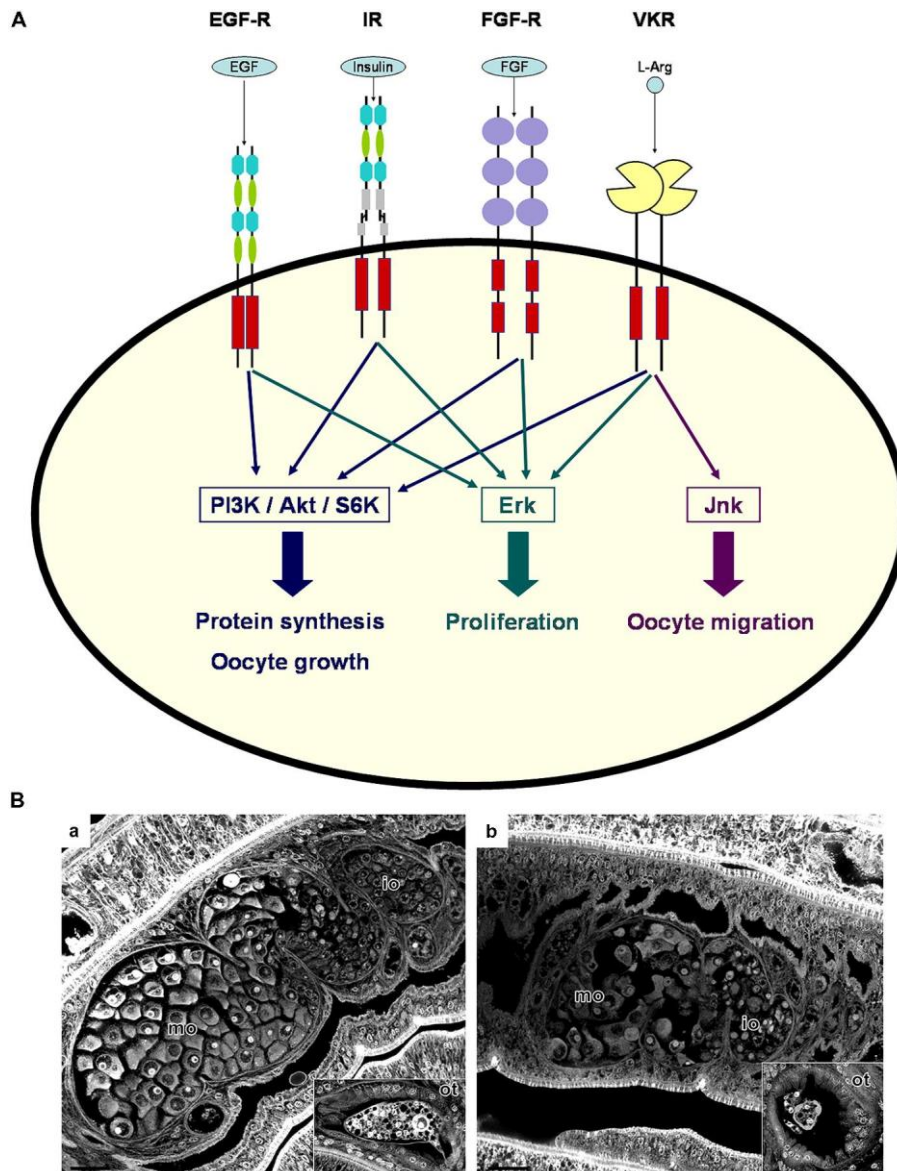


Figure 1: RTK signaling in schistosome gonads. (A) Following activation by their respective ligands, schistosome RTKs (EGF-R, IR, FGF-R and VKR) expressed in gonads can induce protein synthesis, cell growth and proliferation by activating the PI3K/Akt/S6K and Erk MAPK pathways. VKR activation was shown to also activate the Jnk MAPK pathway, potentially involved in oocyte migration. (B) Morphology of the reproductive organs of *S. mansoni* females is affected by *dsSmvkr* RNA interference. Worms were treated with control irrelevant (A) or *dsSmvkr* (B) dsRNAs (as described in Vanderstraete et al., 2014). Whole-mount preparations were stained with carmine red and examined by confocal laser scanning microscopy. In control worms (a), we observe immature oocytes (io) within the smaller, anterior part of the ovary and big and mature oocytes (mo) in the posterior part. The ootype (ot) contains a viable egg formed by one oocyte and vitelline cells. Treatment with *dsSmvkr* (b) induced a strong disorganization and size reduction of the ovary, as well as the abortion of egg formation. Scale bar: 20 μ m.

RTKs as potential targets for the control of schistosomiasis

Given the oncogenic role of aberrant signaling from RTKs in humans, these receptors have become attractive therapeutic targets. This led to the generation and the use in therapy of a large

number of TK inhibitory compounds. Some of them were named as “tyrphostins” (TYRosine PHOSphorylation INnhibitors) (Levitzki and Mishani, 2006), compounds that are able to inhibit multiple RTKs. We have seen that growth factor receptor and tyrosine kinase signaling molecules likely represent key molecules for the development and reproductive activity processes in schistosome worms. Consequently, these molecules are considered as potential targets for novel therapies against schistosomiasis today (Dissous et al., 2007; Dissous and Grevelding, 2011). IR inhibitors (tyrphostins AG1024, AG538 and HNMPA-(AM)3) can potentially affect survival of *S. mansoni* (Ahier et al., 2008) and *S. japonicum* (You et al., 2010) adult worms by blocking the uptake of glucose, an essential nutrient for schistosomes. Imatinib (Gleevec), used in the treatment of multiple cancers but targeting notably the chimeric oncogene BCR-Abl responsible for chronic myelogenous leukemia (Manley et al., 2002) has been described for its fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *S. mansoni in vitro* (Beckmann and Grevelding, 2010). Other TK inhibitors have also revealed a potential usefulness for the prevention of egg production by schistosomes. The Src kinase inhibitor, Herbimycin A, was demonstrated to block mitotic activity, expression of eggshell protein gene and egg production in *S. mansoni* female worms, preferentially inactivating the parasite Src-related SmTK3 and causing its degradation (Knobloch et al., 2006). The Syk inhibitor Piceatannol blocked the kinase activity of SmTK4 of *S. mansoni* and reduced egg production by female worms in vitro (Beckmann et al., 2010b). Furthermore, the angiokinase inhibitor BIBF1120 was shown to block the activities of the FGFR receptors SmFGFR-A and SmFGFR-B from *S. mansoni* leading to severe effects on the morphology of gonad tissues and the gastrodermis, on reproduction leading to reduced egg production, and finally on worm vitality (Hahnel et al., 2014, this issue).

More recently, tyrphostin AG1024 emerged as a potent drug molecule that caused dramatic effects both on the viability of larvae of *S. mansoni* and on the fertility of adult worms. The remarkable efficacy of this TK inhibitor (used at μM doses) on parasites was shown to be due to its dual action on the parasite IR and VKR kinases that contain similar catalytic domains (Vanderstraete et al., 2013b). Figure 2 illustrates the conservation of the catalytic pocket of RTKs characterized in the three human schistosome species. Using a sequence alignment of the TK domain of the various parasite RTKs and the crystal structure of the TK domain of the human insulin receptor, an evolutionary trace analysis revealed that in kinase domains the residues were highly conserved, and particularly those composing the catalytic loop and the ATP-binding site essential for kinase activity (B, C, D). These residues were also identical among all the VKRs characterized in other invertebrate species (A). The conservation of the motifs essential for TK activity in the various schistosome RTKs is very likely accounting for the efficacy of AG1024 to inhibit simultaneously schistosome IR, VKR but also EGFR kinase activities. This was confirmed by the high sensitivity of all these recombinant parasite kinases to AG1024 shown in

kinase assays (Vanderstraete et al., 2014; Dissous et al., 2014a). In females of *S.mansoni* treated with AG1024, important size reduction and disorganization of the ovary were observed together with an inhibition of egg production. AG1024 also affected spermatogenesis in males, and all these data confirmed the potential of AG1024 to affect schistosome reproduction by targeting multiple RTKs. The implication of these RTKs in gametogenesis and reproduction processes are valuable reasons to consider them as interesting targets in new control programs, with the main advantage in the case of VKR that their counterparts are absent from the vertebrate host kinase panel. Structural divergences between catalytic domains of host and schistosome RTKs should now be exploited for the design of molecules able to target schistosome RTKs without affecting human host kinases. This should require for the parasite RTK kinase domains the obtention of X-ray crystal structures that would serve as the basis for designing new pharmaceuticals against schistosomiasis. Alternatively, the use of small molecules as antagonist ligands of the VFT domains of schistosome VKRs should be efficient to interfere specifically with VKR pathways and parasite reproduction.

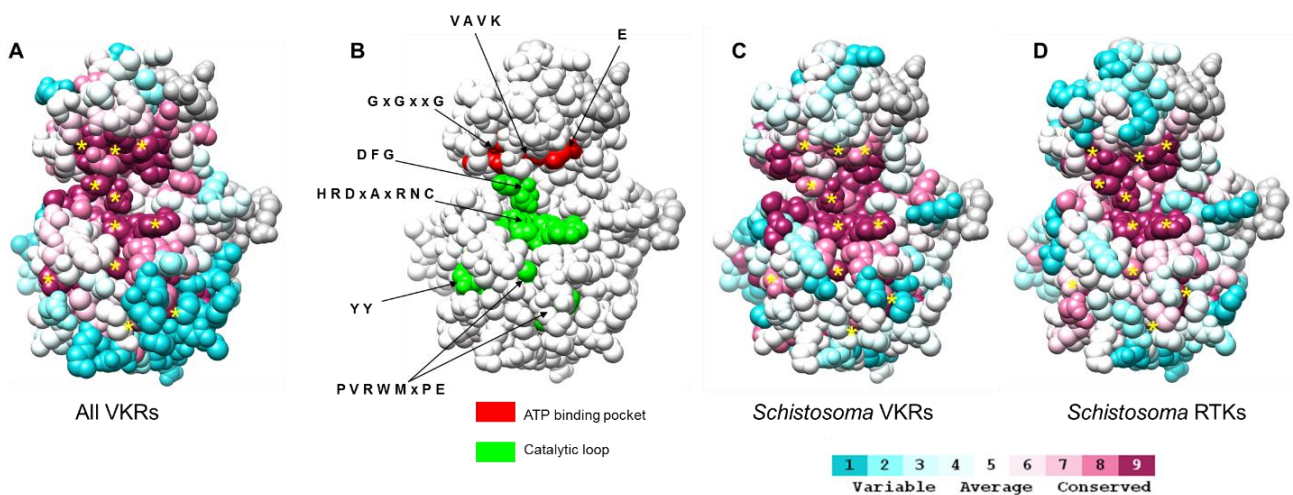


Figure 2: Conservation of schistosome RTK tyrosine kinase catalytic sites. An evolutionary trace analysis of the conservation of residues in TK domains was performed using sequence alignment of (A) 40 VKRs already known in various invertebrate species (Vanderstraete et al., 2013a), (C) four VKRs of *Schistosoma* (SmVKR1 AAL67949.1 and SmVKR2 ADD91576.1, and two VKRs of *Schistosoma haematobium* Sha_103537 and Sha_104501), (D) various *Schistosoma* RTKs (EGF, insulin and VKR receptors) including SmVKR1, SmVKR2, the two ShVKRs, SmIR1 (AAN39120), SmIR2 (AAV65745.2), SJIR1 (ACT20714.1), SJIR2 (ACT20715.1) and SER (AAA29866.1). Visualization of the conservation was performed on the human IR TK crystal structure (PDB accession number 1IRK) (Ahier et al., 2009). The alignment generated with ClustalW was submitted to the ConSurf website server (<http://consurf.tau.ac.il>) (Landau et al., 2005). Conservation scores of each residue were calculated by taking into account the phylogenetic relationships among the sequences and the similarity between the amino acids in the alignment. Conservation scores are according to a color scale from variable (blue) to conserved (purple) residues. In (B), are indicated the crucial residues of the ATP binding pocket (red) and of the catalytic loop (green) required for kinase activity. The evolutionary trace analyses revealed that these crucial residues (indicated by * in A, C, D) are highly conserved among all VKRs (A, C) and among the panel of *Schistosoma* RTKs (EGF, insulin and VKR receptors) from the three human species (*mansoni*, *haematobium* and *japonicum*).

References

- Ahier, A., Khayath, N., Vicogne, J., and Dissous, C. (2008). Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite* 15, 573-579
- Ahier, A., Rondard, P., Gouignard, N., Khayath, N., Huang, S., Trolet, J., Donoghue, D.J., Gauthier, M., Pin, J.P., and Dissous, C. (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. doi: 10.1371/journal.pone.0005651
- Andrade, L., Nahum, L.A., Avelar, L.G.A., Silva, L.L., Zerlotini, A., Ruiz, J.C., and Oliveira, G. (2011). Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics* 12, 215-234. doi: 10.1186/1471-2164-12-215
- Arsic, D., and Guerin, P.M. (2008). Nutrient content of diet affects the signaling activity of the insulin/target of rapamycin/p70 S6 kinase pathway in the african malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Insect. Physiol.* 54, 1226-1235. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.06.003
- Avelar, L.G.A., Nahum, L.A., Andrade, L.F., and Oliveira, G. (2011). Functional diversity of the *Schistosoma mansoni* tyrosine kinases. *J.Signal Transduct.* 603290. doi: 10.1155/2011/603290
- Beall, J., McGonigle, S., and Pearce, E. (2000). Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF beta signaling. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 131-142. doi: 10.1016/S0166-6851(00)00307-8
- Beall, M.J., and Pearce, E.J. (2001). Human transforming growth factor-beta activates a receptor serine/threonine kinase from the intravascular parasite *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 276, 31613-31619. doi: 10.1074/jbc.M104685200
- Beckmann, S., and Grevelding, C.G. (2010). Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro. *Int. J. Parasitol.* 40(5): 521-526. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.01.007
- Beckmann, S., Quack, T., Burmeister, C., Buro, C., Long, T., Dissous, C., and Grevelding, C.G. (2010a). *Schistosoma mansoni*: signal transduction processes during the development of the reproductive organs. *Parasitology* 137, 497-520. doi: 10.1017/S0031182010000053
- Beckmann, S., Buro, C., Dissous, C., Hirzmann, J., and Grevelding, C.G. (2010b) The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. *PLoS Pathog.* 6(2): e1000769. doi:10.1371/journal.ppat.1000769
- Beckmann, S., Hahnel, S., Cailliau, K., Vanderstraete, M., Browaeys, E., Dissous, C., and Grevelding, C.G. (2011). Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 286, 42325-42336. doi: 10.1074/jbc.M110.210336
- Beckmann, S., Quack, T., Dissous, C., Cailliau, K., Lang, G., and Grevelding, C.G. (2012). Discovery of platyhelminth-specific α/β -integrin families and evidence for their role in reproduction in *Schistosoma mansoni*. *PloS One* 7:e52519. doi: 10.1371/journal.pone.0052519
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., Mashiyama, S.T., Al Lazikani, B., Andrade, L.F., Ashton, P.D., Aslett, M.A., Bartholomeu, D.C., Blandin, G., Caffrey, C.R., Coghlan, A., Coulson, R., Day, T.A., Delcher, A., DeMarco, R., Djikeng, A., Eyre, T., Gamble,

- J.A., Ghedin, E., Gu, Y., Hertz-Fowler, C., Hirai, H., Hirai, Y., Houston, R., Ivens, A., Johnston, D.A., Lacerda, D., Macedo, C.D., McVeigh, P., Ning, Z., Oliveira, G., Overington, J.P., Parkhill, J., Pertea, M., Pierce, R.J., Protasio, A.V., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Sajid, M., Salzberg, S.L., Stanke, M., Tivey, A.R., White, O., Williams, D.L., Wortman, J., Wu, W., Zamanian, M., Zerlotini, A., Fraser-Liggett, C.M., Barrell, B.G., and El Sayed, N.M. (2009). The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460(7253), 352-358. doi: 10.1038/nature08160
- Brown, M.R., Clark, K.D., Gulia, M., Zhao, Z., Garczynski, S.F., Crim, J.W., Suderman, R.J., and Strand, M.R. (2008). An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5716-5721. doi: 10.1073/pnas.0800478105
- Buro, C., Oliveira, K.C., Lu, Z., Leutner, S., Beckmann, S., Dissous, C., Cailliau, K., Verjovski-Almeida, S., and Grevelding, C.G. (2013). Transcriptome analyses of inhibitor-treated schistosome females provide evidence for cooperating Src-kinase and TGF β receptor pathways controlling mitosis and eggshell formation. *PLoS Pathog.* 9:e1003448. doi: 10.1371/journal.ppat.1003448
- Buro, C., Beckmann, S., Oliveira, K.C., Dissous, C., Cailliau, K., Marhöfer, R.J., Selzer, P.M., Verjovski-Almeida, S., and Grevelding, C.G. (2014). Imatinib treatment causes substantial transcriptional changes in adult *Schistosoma mansoni* in vitro exhibiting pleiotropic effects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* in press
- Chitsulo, L., LoVerde, P., and Engels, D. (2004). Schistosomiasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 12-13. doi:10.1038/nrmicro801
- Chuderland, D., Dvashi, Z., Kaplan-Kraicer, R., Ben-Meir, D., Shalgi, R., and Lavi, S. (2012). De novo synthesis of protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform (PPM1A) during oocyte maturation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 17, 433-445. doi:10.2478/s11658-012-0022-7
- Davies, S.J., Shoemaker, C.B., and Pearce, E.J. (1998). A divergent member of the transforming growth factor beta receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 11234-11240
- Den Hollander, J.E., and Erasmus, D.A. (1985). *Schistosoma mansoni*: male stimulation and DNA synthesis by the female. *Parasitology* 91, 449-457
- Dissous, C., Ahier, A., and Khayath, N. (2007). Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *Bioessays* 29, 1281-1288. doi: 10.1002/bies.20662
- Dissous, C., and Grevelding, C.G. (2011). Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective? *Trends Parasitol.* 27, 59-66. doi: 10.1016/j.pt.2010.09.001
- Dissous, C., Vanderstraete, M., Beckmann, S., Gougnard, N., Leutner, S., Buro, C., and Grevelding, C.G. (2014a). "Receptor Tyrosine kinase signaling and drug targeting in schistosomes" in *Protein phosphorylation in parasites: novel targets for antiparasitic intervention*, ed. C. Doerig, G. Späth, M. Wiese (Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KgaA), 337-356
- Dissous, C., Morel, M., and Vanderstraete, M. (2014b). Venus Kinase Receptors: prospects in signaling and biological functions of these invertebrate receptors. *Front. Endocrinol.* 5, 72. doi: 10.3389/fendo.2014.00072
- Doenhoff, M.J., Cioli, D., and Utzinger, J. (2008). Praziquantel: Mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 659-667. doi: 10.1097/QCO.0b013e328318978f

- Erasmus, D.A. (1973). A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 67, 165-183. doi: 10.1017/S0031182000046394
- Freitas, T.C., Jung, E., and Pearce, E.J. (2007). TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 3:e52. doi: 10.1371/journal.ppat.0030052
- Galanti, S.E., Huang, S.C., and Pearce, E.J. (2012) Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(2):e1509. doi: 10.1371/journal.pntd.0001509
- Gobert, G.N., McManus, D.P., Nawaratna, S., Moertel, L., Mulvenna, J., and Jones, MK. (2009). Tissue specific profiling of females of *Schistosoma japonicum* by integrated laser microdissection microscopy and microarray analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e469. doi: 10.1371/journal.pntd.0000469
- Gouignard, N., Vanderstraete, M., Cailliau, K., Lescuyer, A., Browaeys, E., and Dissous, C. (2012). *Schistosoma mansoni*: structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. *Exp. Parasitol.* 132, 32-39. doi: 10.1016/j.exppara.2011.05.007
- Graf, R., Neuenschwander, S., Brown, M.R., and Ackermann, U. (1997). Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homologue from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 6, 151-163
- Hahnel, S., Lu, Z., Wilson, R.A., Grevelding, C.G., and Quack, T. (2013). Whole-organ isolation approach as a basis for tissue-specific analyses in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2336. doi:10.1371/journal.pntd.0002336
- Hahnel, S., Quack, T., Parker-Manuel, S. J., Lu, Z., Vanderstraete, M., Morel, M., Dissous, C., Cailliau, K., and Grevelding, C.G. (2014). Gonad RNA-specific qRT-PCR analyses identify genes with potential functions in schistosome reproduction such as SmFz1 and SmFGFRs. *Front. Genet.* 5:170. doi: 10.3389/fgene.2014.00170
- Hoffmann, K.F., Wynn, T.A., and Dunne, D.A. (2002). Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. *Adv. Parasitol.* 52, 265-307. doi: 10.1016/S0065-308X(02)52014-5
- Huang, X., Tong, J.S., Wang, Z.B., Yang, C.R., Qi, S.T., Guo, L., Ouyang, Y.C., Quan, S., Sun, Q.Y., Qi, Z.Q., Huang, R.X., and Wang, H.L. (2011). JNK2 participates in spindle assembly during mouse oocyte meiotic maturation. *Microsc. Microanal.* 7, 197-205. doi: 10.1017/S1431927610094456
- Kapp, K., Knobloch, J., Schussler, P., Sroka, S., Lammers, R., Kunz, W., and Grevelding, C.G. (2004). The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 171-182. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.07.010
- Khayath, N., Vicogne, J., Ahier, A., Ben Younes, A., Konrad, C., Trolet, J., Viscogliosi, E., Brehm, K., and Dissous, C. (2007). Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Febs J.* 274, 659-676. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05610.x
- Kim, J.J., and Accili, D. (2002) Signaling through IGF-1 and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Horm. IGF Res.* 12, 84-90. doi: 10.1054/ghir.2002.0265

- Knobloch, J., Winnen, R., Quack, M., Kunz, W., and Grevelding, C.G. (2002). A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* 294, 87-97. doi: 10.1016/S0378-1119(02)00760-6
- Knobloch, J., Kunz, W., and Grevelding, C.G. (2002). Quantification of DNA synthesis in multicellular organisms by a combined DAPI and BrdU technique. *Dev. Growth Differ.* 44, 559-563. doi: 10.1046/j.1440-169X.2002.00667.x
- Knobloch, J., Rossi, A., Osman, A., LoVerde, P.T., Klinkert, M.Q., and Grevelding, C.G. (2004). Cytological and biochemical evidence for a gonad-preferential interplay of SmFKBP12 and SmTbetaR-I in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 227-36. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.09.006
- Knobloch, J., Kunz, W., and Grevelding, C.G. (2006). Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 36, 1261-72. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.06.004
- Knobloch, J., Beckmann, S., Burmeister, C., Quack, T., and Grevelding, C.G. (2007). Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 117, 318-336. doi: 10.1016/j.exppara.2007.04.006
- Kunz, W. (2001). Schistosome male-female interaction: Induction of germ-cell differentiation. *Trends Parasitol.* 17, 227-231. doi: 10.1016/S1471-4922(01)01893-1
- Landau, M., Mayrose, I., Rosenberg, Y., Glaser, F., Martz, E., Pupko, T., and Ben-Tal, N. (2005). ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Res.* 33, W299-W302. doi: 10.1093/nar/gki370
- Levitzki, A., and Mishani, E. (2006). Tyrosine kinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 93-109. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142657
- LoVerde, P.T., and Chen, L. (1991). Schistosome female reproductive development. *Parasitol. Today* 7, 303-308. doi: 10.1016/0169-4758(91)90263-N
- LoVerde, P.T., Osman, A., and Hinck, A.P. (2007). *Schistosoma mansoni*: TGF- β signaling pathways. *Exp. Parasitol.* 117, 304-317. doi: 10.1016/j.exppara.2007.06.002
- LoVerde, P.T., Andrade, L.F., and Oliveira, G. (2009). Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 422-428. doi: 10.1016/j.mib.2009.06.005
- Manley, P.W., Cowan-Jacob, S.W., Buchdunger, E., Fabbro, D., Fendrich, G., Furet, P.,
- Meyer, T., and Zimmermann, J., (2002). Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Eur. J. Cancer* 38 (Suppl. 5), S19-S27.
- Melman, S.D., Steinauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., and Loker, E.S. (2009). Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e504. doi: 10.1371/journal.pntd.0000504
- Nawaratna, S.S., McManus, D.P., Moertel, L., Gobert, G.N., and Jones, M.K. (2011). Gene atlasing of digestive and reproductive tissues in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e1043. doi: 10.1371/journal.pntd.0001043

- Osman, A., Niles, E.G., and LoVerde, P.T. (2001). Identification and characterization of a Smad2 homologue from *Schistosoma mansoni*, a transforming growth factor-beta signal transducer. *J. Biol. Chem.* 276, 10072-10082. doi: 10.1074/jbc.M005933200
- Osman, A., Niles, E.G., and LoVerde, P.T. (2004). Expression of functional *Schistosoma mansoni* Smad4: role in Erk-mediated transforming growth factor beta (TGF-beta) down-regulation. *J. Biol. Chem.* 279, 6474-6486. doi: 10.1074/jbc.M310949200
- Osman, A., Niles, E.G., Verjovski-Almeida, S., and LoVerde, P.T. (2006). *Schistosoma mansoni* TGF-beta receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathog.* 2: e54. doi: 10.1371/journal.ppat.0020054
- Parrott, B.B., Hudson, A., Brady, R., and Schulz, C. (2012) Control of germline stem cell division frequency-a novel, developmentally regulated role for epidermal growth factor signaling. *PLoS One* 7:e36460. doi: 10.1371/journal.pone.0036460.
- Pin, J.P., Galvez, T., and Prézeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 98, 325-354. doi: 10.1016/S0163-7258(03)00038-X
- Popiel, I., and Basch, P.F. (1984). Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. *J. Exp. Zool.* 232, 141-150
- Protasio, A.V., Tsai, I.J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M.A., De Silva, N., Velarde, G.S., Anderson, T.J., Clark, R.C., Davidson, C., Dillon, G.P., Holroyd, N.E., LoVerde, P.T., Lloyd, C., McQuillan, J., Oliveira, G., Otto, T.D., Parker-Manuel, S.J., Quail, M.A., Wilson, R.A., Zerlotini, A., Dunne, D.W., and Berriman, M. (2012). A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(1):e1455. doi: 10.1371/journal.pntd.0001455
- Sackton, K.L., Buehner, N.A., and Wolfner, M.F. (2007). Modulation of MAPK activities during egg activation in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 1, 222-227
- Schneider, M.R., and Wolf, E. (2008). The epidermal growth factor receptor and its ligands in female reproduction: insights from rodent models. *Cytokine&Growth Factor Rev.* 19, 173-181. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.01.003
- Shoemaker, C.B., Ramachandran, H., Landa, A., dos Reis, M.G., and Stein, L.D. (1992). Alternative splicing of the *Schistosoma mansoni* gene encoding a homologue of epidermal growth factor receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 53, 17-32
- Sirotkin, A.V. (2011). Growth factors controlling ovarian functions. *J. Cell. Physiol.* 226, 2222-2225. doi: 10.1002/jcp.22588
- Skelly, P.J., Kim, J.W., Cunningham, J., and Shoemaker, C.B. (1994). Cloning, characterization and functional expression of cDNAs encoding glucose transporter proteins from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 269, 4247-4253
- Smith, P., Leung-Chiu, W.M., Montgomery, R., Orsborn, A., Kuznicki, K. Gressman-Coberly, E., Mutapcic, L., and Bennett, K. (2002). The GLH proteins, *Caenorhabditis elegans* P granule components, associate with CSN-5 and KGB-1, proteins necessary for fertility, and with ZYX-1, a predicted cytoskeletal protein. *Dev. Biol.* 251, 333-347. doi: 10.1006/dbio.2002.0832

- Suga, H., Dacre, M., de Mendoza, A., Shalchian-Tabrizi, K., Manning, G., and Ruiz-Trillo, I. (2012). Genomic survey of premetazoans shows deep conservation of cytoplasmic tyrosine kinases and multiple radiations of receptor tyrosine kinases. *Sci. Signal.* 5:ra35. doi: 10.1126/scisignal.2002733
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212. doi: 10.1016/0092-8674(90)90801-K
- Vanderstraete, M., Gouignard, N., Ahier, A., Morel, M., Vicogne, J., and Dissous, C. (2013a). The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. *BMC Genomics* 14, 361. doi: 10.1186/1471-2164-14-36.
- Vanderstraete, M., Gouignard, N., Cailliau, K., Morel, M., Lancelot, J., Bodart, J.F., and Dissous, C. (2013b). Dual targeting of insulin and venus kinase Receptors of *Schistosoma mansoni* for novel anti-schistosome therapy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2226. doi:10.1371/journal.pntd.0002226
- Vanderstraete, M., Gouignard, N., Cailliau, K., Morel, M., Hahnel, S., Leutner, S., Beckmann, S., Grevelding, C.G., and Dissous, C. (2014). Venus Kinase Receptors control reproduction in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *PloS Pathog.* 10(5):e1004138. doi: 10.1371/journal.ppat.1004138
- Vicogne, J., Pin, J.P., Lardans, V., Capron, M., Noël, C., and Dissous, C. (2003). An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 51-62. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00249-9
- Vicogne, J., Cailliau, K., Tulasne, D., Browaeys, E., Yan, Y., Fafeur, V., Vilain, J.P., Legrand, D., Trolet, J., and Dissous, C. (2004). Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 279, 37407-37414. doi: 10.1074/jbc.M313738200
- You, H., Zhang, W., Jones, M.K., Gobert, G., Mulvenna, J., Rees, G., Spanevello, M., Blair, D., Duke, M., Brehm, K., and McManus, D.P. (2010). Cloning and characterization of *Schistosoma japonicum* insulin receptors. *PloS One* 5: e9868. doi: 10.1371/journal.pone.0009868
- You, H., Gobert, G.N., Duke, M.G., Zhang, W., Li, Y., Jones, M.K., and Mc Manus, D.P. (2012). The insulin receptor is a transmission blocking veterinary vaccine target for zoonotic *Schistosoma japonicum*. *Int. J. Parasitol.* 42, 801-807. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.06.002
- Young, N.D., Jex, A.R., Li, B., Liu, S., Yang, L., Xiong, Z., Li, Y., Cantacessi, C., Hall, R.S., Xu, X., Chen, F., Wu, X., Zerlotini, A., Oliveira, G., Hofmann, A., Zhang, G., Fang, X., Kang, Y., Campbell, B.E., Loukas, A., Ranganathan, S., Rollinson, D., Rinaldi, G., Brindley, P.J., Yang, H., Wang, J., Wang, J. and Gasser, R.B.(2012) Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium*. *Nature Genet.* 44, 221-225. doi: 10.1038/ng.1065

II. Caractérisation de la kinase Akt/PKB et potentiel en tant que cible thérapeutique

Suite aux études précédentes concernant le pouvoir inhibiteur de l'AG1024 sur les RTKs de *S. mansoni*, le criblage d'une banque d'inhibiteurs de kinases (Calbiochem® InhibitorSelect™ 96-Well Protein Kinase Inhibitor Library I) a été entrepris. Cette banque d'inhibiteurs consiste en 80 composés bien caractérisés, fournis pour la plupart à une concentration de 10 mM et parmi lesquels figure l'AG1024.

Dans le cadre d'un premier criblage effectué avec Mathieu Vanderstraete, l'ensemble des inhibiteurs a été testé, en trois réplicats biologiques, sur des couples de parasites adultes en culture à une concentration de 10 µM et l'appariement ainsi que la ponte des vers ont été mesurés pendant 72 heures. Nous avons confirmé l'effet délétère de l'AG1024 ayant été préalablement observé sur les parasites (Vanderstraete et al., 2013b^{Annexe 4}), et utilisé cet inhibiteur comme contrôle positif.

Les résultats obtenus lors de ce criblage ont confirmé des données déjà acquises concernant le rôle de différentes protéines kinases dans la reproduction du parasite. En effet, le traitement des vers adultes avec des inhibiteurs d'EGFR, d'IR, de FGFR, des CTKs Src, Abl, Fyn, Syk, du TGFβR et de la PKC induisait une diminution significative de l'appariement et/ou de la ponte.

En parallèle, nous avons observé que 3 des 5 inhibiteurs d'Akt présents dans le panel de composés induisaient un fort désappariement des parasites en culture en seulement 24 heures. Ces résultats préliminaires nous ont encouragés à centrer les études suivantes sur les 3 inhibiteurs d'Akt les plus efficaces ainsi identifiés et sur la caractérisation de SmAkt, qui n'avait encore jamais été effectuée chez le parasite.

Dans un premier temps, j'ai entrepris le clonage et la caractérisation de SmAkt, ce qui nous a permis de montrer que la protéine du parasite était bien conservée. L'analyse de la séquence a mis en évidence la présence d'un domaine PH (Pleckstrin Homology), permettant sa liaison à la membrane ; d'un domaine Ser/Thr kinase (S/TK), présentant l'ensemble des motifs nécessaires à son activité dont le résidu conservé T₄₀₁ ; d'un domaine de régulation en position C-terminale contenant le résidu conservé S₅₆₅. L'activation d'Akt fait suite à la phosphorylation de la T₄₀₁ par la PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1) puis l'activité de la kinase est renforcée par la phosphorylation de la S₅₆₅ par mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 2).

Des études structurales ont montré que l'interaction entre les domaines PH et S/TK maintient les protéines Akt en conformation inactive. Ainsi, dans des conditions normales, l'activation d'Akt se fait

suite à la liaison entre son domaine PH et les phospholipides PIP3 (Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate) qui rompt l'interaction entre les domaines PH-S/TK, rendant accessible le résidu Thréonine qui peut alors être phosphorylé par PDK1.

Dans certains cancers humains, la mutation de certains résidus présents dans le domaine PH conduit à l'activation constitutive d'Akt (Parikh et al., 2012). Basé sur ces études, j'ai produit des mutants constitutivement actifs de SmAkt (SmAkt E₁₁₇K et SmAkt L₁₅₀R) afin d'étudier l'effet des inhibiteurs d'Akt sur l'activité de la protéine recombinante du parasite.

L'expression de ces mutants de SmAkt dans le modèle d'ovocyte de xénope, en collaboration avec le Dr Katia Cailliau, a permis de vérifier leur phosphorylation. Nous avons ainsi pu montrer que les inhibiteurs d'Akt étaient capables d'inhiber cette phosphorylation.

En parallèle, j'ai testé les 3 inhibiteurs d'Akt ayant un effet sur les parasites (A4, A7 et A8) à différentes concentrations (de 10 nM à 10 µM) à la fois sur les parasites adultes et sur les schistosomules.

Ces études ont permis de mettre en évidence une forte capacité de l'inhibiteur A4 à affecter l'appariement et la ponte des vers adultes à une concentration de 50 nM (90% de désappariement en 48 h). En revanche, une concentration de 5 µM des inhibiteurs A7 et A8 est nécessaire pour observer ce même effet.

Concernant les schistosomules, l'inhibiteur A8 induit 100% de mortalité des larves en 24h à une concentration de 1 µM tandis qu'une concentration de 5 µM des composés A4 et A7 est nécessaire pour entraîner une forte mortalité des schistosomules.

L'action différente des inhibiteurs est difficile à expliquer mais elle est certainement due à leur perméabilité, à leur stabilité dans le milieu de culture des parasites ou à leur effet non spécifique. En effet, si les composés A5, A6 et A7 sont sélectifs pour Akt, ce n'est pas le cas des inhibiteurs A4 et A8 qui sont également capables d'inhiber les kinases en amont d'Akt telle que PDK1. Un gène codant pour PDK1 a été détecté chez *S. mansoni* (CAZ265894). Il est tentant de supposer que la double-spécificité des inhibiteurs A4 et A8 a été responsable d'un effet plus marqué chez le parasite en comparaison des autres inhibiteurs.

La voie Akt/PKB joue un rôle essentiel dans la transduction du signal de nombreux RTKs et celle-ci est notamment activée par les VKRs (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}; Vogel et al., 2015). L'ensemble des données suggère que les voies de signalisation induisant SmAkt pourraient être impliquées dans la reproduction des schistosomes et qu'elles constituent ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques très intéressantes pour lutter contre la schistosomiase.

Compound library screening identified Akt/PKB kinase pathway inhibitors as potential key molecules for the development of new chemotherapeutics against schistosomiasis

Marion Morel^a, Mathieu Vanderstraete^a, Katia Cailliau^b, Arlette Lescuyer^b,
Julien Lancelot^a, Colette Dissous^{a §}

^a CIIL - Center of Infection and Immunity of Lille, Université Lille Nord de France, Inserm U1019, CNRS-UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex, France

^b Laboratoire de Régulation des Signaux de Division, Université Lille 1 Sciences et Technology, EA 4479, IFR 147, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

[§] Corresponding author: Colette Dissous
CIIL - Center of Infection and Immunity of Lille,
Université Lille Nord de France,
Inserm U1019, CNRS-UMR 8204, Institut Pasteur de Lille, 59019
Lille Cedex, France

Phone: 33 3 20 87 73 50

Fax: 33 3 20 87 78 88

E-mail: colette.dissous@pasteur-lille.fr

Abstract:

Protein kinases (PKs) are one of the largest protein families in most eukaryotic organisms. These enzymes are involved in the control of cell proliferation, differentiation and metabolism and a large number of the anticancer drugs currently used are directed against PKs. The structure and function of PKs are well conserved throughout evolution. In schistosome parasites, PKs were shown to be involved in essential functions at every stage of the parasite life cycle, making these enzymes promising anti-parasite drug targets. In this study, we tested a panel of commercial inhibitors for various PKs and analyzed their effects on pairing and egg production by schistosomes as well as their toxicity towards schistosomula larvae. Results obtained confirmed the deleterious effect of PK targeting on *Schistosoma mansoni* physiology and the important function of different tyrosine and serine/threonine kinases in the biology and reproduction of this parasite. They also indicated for the first time that the Protein Kinase B (also called Akt) which is a major downstream target of many receptor tyrosine kinases and a central player at the crossroads of signal transduction pathways activated in response to growth factors and insulin, can constitute a novel target for anti-schistosome chemotherapy. Structural and functional studies have shown that SmAkt is a conserved kinase and that its activity can be inhibited by commercially available Akt inhibitors. In treated adult worms, Akt/PKB kinase pathway inhibitors induced profound alterations in pairing and egg laying and they also greatly affected the viability of schistosomula larvae.

Keywords:

Protein kinase; inhibitor; protein kinase B (PKB); Akt; *Schistosoma mansoni*; chemotherapy

1. Introduction

Schistosomiasis is a disease with major medical and economic importance affecting human and cattle. It is the second major parasitic disease after malaria with more than 230 million individuals infected in the world, and a number of annual deaths estimated to 200 thousands (Colley et al., 2014). Chemotherapy of schistosomiasis relies on a single drug, Praziquantel (PZQ), which efficiently reduces morbidity and mortality due to the disease. However, mass treatment has raised concerns regarding the emergence of resistance to this drug (Doenhoff and Pica-Mattocchia, 2006; Pica-Mattocchia et al., 2009; Melman et al., 2009). This has motivated the search for alternative treatments and intensive efforts have been made during last years to identify novel molecular targets for chemotherapy (Doenhoff et al., 2008; DeMarco and Verjovski-Almeida, 2009).

Protein kinases (PKs) are one of the largest protein families in most eukaryotic organisms. PKs are involved in the control of cell proliferation, differentiation and metabolism and these druggable enzymes are well conserved throughout evolution. Their biochemical characteristics are well studied due to their importance in cancer, and a large variety of small molecules targeting selectively kinase activities is now commercially available and already used for human cancer therapy (Johnson, 2009). In schistosomes, many studies have shown that PKs are implicated in essential functions at every stage of the parasite life cycle, and that these enzymes represent suitable anti-parasite drug targets (Dissous et al., 2007, 2014a; Dissous and Grevelding, 2011; Beckmann et al., 2012).

Tyrosine Kinases (TKs) have been considered as good candidates because of their essential roles in development and metabolism (Dissous et al., 2006, 2007; Dissous and Grevelding, 2011). The tyrosine kinome of *S. mansoni* comprises 15 receptor TKs (RTKs) and 19 cytosolic TKs (CTKs) (Andrade et al., 2011 ; Avelar et al., 2011). Receptor TKs (RTKs) regulate many cellular activities such as proliferation, migration or differentiation, and they are the first actors in TK signaling, being able to integrate perception, response to extracellular signals and propagation by phosphorylation of intracellular targets (Hubbard and Till, 2000). Seven RTK molecules have been studied for their role in the control of parasite development and/or reproduction processes. SER (*Schistosoma* Epidermal growth factor Receptor) plays potential role in host-parasite interactions, and parasite growth and reproduction (Vicogne et al., 2004). Two insulin receptors (IR) are involved, respectively, in regulating sugar uptake and growth of schistosomes (Khayath et al., 2007; Ahier et al., 2008). Recently, two Venus Kinase Receptors (VKR), that belong to a novel family of RTKs (discovered for the first time in schistosomes) (Vicogne et al., 2003; Vanderstraete et al., 2013a; Dissous et al., 2014b) and that possess a TK domain similar to that of IR (Ahier et al., 2009; Gougnard et al., 2012), were demonstrated to control parasite reproductive activities (Vanderstraete et al., 2014). Also, two proteins of the FGFR

(Fibroblast Growth Factor Receptor) family could participate with these RTKs in the development of reproductive organs (Hahnel et al., 2014; Morel et al., 2014). All these schistosome RTKs can be inhibited by commercially available kinase inhibitors as well as the non-receptor CTKs that participate to their downstream signaling. Particularly, three schistosome CTKs- SmTK3 (Src kinase (Kapp et al., 2004)), SmTK4 (Syk kinase (Knobloch et al., 2002) and SmTK6 (Src/Abl-like kinase (Beckmann et al., 2011))- presumably act in a multikinase complex and their participation to RTK signaling can be inhibited by specific TK inhibitors (Beckmann et al., 2011).

Besides the importance of TK proteins as druggable enzymes, a large number of kinases phosphorylating Serine/Threonine (S/T) residues have been characterized in schistosomes and some of them were described as potential targets against these parasites. Particularly, biochemical approaches and functional screening of activin/TGF β receptor, Polo, Ste 20, MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (ERK, p38 and JNK), MEK (Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase) and AGC (PKC (Ca-dependent protein kinase C) and PKA (cyclic AMP-dependent protein kinase)) kinase families have supported the roles of S/T kinases in cell proliferation, motor activity and reproduction. Evidence has been obtained that TGF- β pathways play a major role in female reproductive development and egg embryogenesis (Knobloch et al., 2006; Loverde et al., 2007; 2009; Buro et al., 2013). Inhibition of SmPlk1 (the schistosome Polo-like kinase homolog of the major mitotic kinase overexpressed in many human tumors (Strebhardt, 2010)) by the anticancer compound BI2536 caused profound alterations of the reproductive organs in males and females *in vitro*, including a reduction of gamete production (Long et al., 2010). Pharmacological modulation of ERK activity in adult worms using the MEK inhibitor, U0126, disturbed significantly the physiology of parasites and the PKC inhibitor, GF109203X, was shown to inhibit worm pairing, egg output, and ventral sucker attachment (Ressurreição et al., 2014). PKC belongs to the AGC group of kinases which are cytoplasmic serine/threonine kinases regulated by secondary messengers such as cyclic nucleotide AMP (for PKA) or GMP (for PKG) or by lipids (for PKC and PKB also called Akt). RNAi experiments in combination with PKA inhibitors H-89 or PKI 14-22 amide have demonstrated the importance of PKA activity for schistosome viability and egg production (Swierczewski and Davies, 2009; 2010) and interference with the PKG activity of the *S. mansoni* SmcGK by a cGMP analog induced slow motion and reduced egg production by schistosomes (Leutner et al., 2011). However, the role of PKB/Akt proteins in viability and fertility of schistosomes has not been described.

Akt/PKB kinases are attractive targets for drug discovery due to their key role in tumor cell survival or proliferation and to their overexpression or activation in many cancers. Small molecule inhibitors targeting the Akt signaling pathway are very promising therapeutics against cancer (Pal et al., 2000; Kumar and Madison, 2005). In this study, we have tested a new panel of commercial

inhibitors for various PKs and we analyzed their effects on pairing and egg production by schistosomes as well as their toxicity towards schistosomula larvae of *S. mansoni*. Results confirmed the deleterious effect of targeting PKs on schistosome physiology and indicated that signaling of SmAkt, the PKB/Akt homolog of *S. mansoni*, can constitute a novel potential target for anti-schistosome chemotherapy. Structural and functional studies have shown that SmAkt is a conserved kinase and that its activity can be inhibited by commercially available Akt inhibitors. Three of these inhibitors induced profound alterations in pairing and egg laying in treated worms and they also greatly affected the viability of schistosomula.

2. Materials and Methods

2.1. 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. Schistosomula were prepared as described previously (Dissous et al., 1981). Experiments with hamsters infected by cercariae were 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 were 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).

2.2. *In silico* analyses

Sequences were analyzed using the LASERGENE package (DNASStar, Madison, WI, USA). tBLASTn and BLASTn analyses were performed using the NCBI databank <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/Blast.cgi>. Akt/PKB, PKA and PKC protein sequences were aligned using ClustalW algorithm in the BioEdit v7.1 software, and manually corrected. Neighbor-Joining trees were built using MEGA5 (Tamura et al., 2011) under the JTT model, with 1000 bootstrap repetitions.

2.3. Protein kinase inhibitors

The InhibitorSelect™ 96-Well Protein Kinase Inhibitor Library I from Calbiochem® consists of 80, well-characterized, cell-permeable, potent and reversible protein kinase inhibitors. Each inhibitor

was provided in solution in DMSO at a concentration of 10 mM (except the PI3K inhibitor E10 provided at 5 mM).

2.4. Treatment of cultured adult worms with inhibitors

Ten pairs of adult *S. mansoni* were incubated for 72 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere in 6-well plates containing 2 mL of M199 medium (Invitrogen) supplemented with HEPES 10 mM, pH 7.4, penicillin (50 U/mL), streptomycin (50 µg/mL), gentamycin (15 µg/mL), rifampicin (60 µg/mL) and 10% fetal calf serum (Gibco) (hereafter referred as M199 complete medium) in the presence of each compound of the inhibitor library at 10 µM final concentration. Akt inhibitors (A4, A7 and A8) were added at concentrations ranging from 10 nM to 10 µM. Medium containing eggs was harvested everyday and replaced by fresh medium with inhibitors. Medium fractions were pooled and their content in eggs was determined after centrifugation. The number of paired couples was estimated every day by stereomicroscopy.

2.4. Treatment of schistosomula larvae with inhibitors

500 schistosomula were incubated for 72 h in 48-well plates containing 500 µL of M199 complete medium with different concentrations (from 50 nM to 10 µM) of A4, A7 and A8 compounds. Culture medium with inhibitors was refreshed daily. Parasite death was assessed optically under microscope each day using three criteria: absence of motility, tegument defects and granular appearance. A minimum of 300 larvae was observed for each condition, and the ratio dead/total larvae was calculated.

2.5. Molecular cloning of *S. mansoni* Akt

A putative *S. mansoni* Akt sequence was identified in Genbank (XM_002578520.1) by tBLASTp analyses of the *S. mansoni* genome data bases (Berriman et al., 2009). 5' and 3' UTR were determined with the SmAkt encoding ESTs AM042871.1, CF497410.2, AA169931.1 and CF498818.1. The cDNA sequence of SmAkt was obtained by PCR amplification of total cDNA obtained from adult *S. mansoni* RNA (prepared using TRIzol® reagent, Invitrogen) by reverse transcription using the Superscript III (Invitrogen). The SmAkt sequence was amplified using SmAktFLf (5'-CGGCACGAGGCCAAGTCTTAAATGCTAGT-3') and SmAktFLr (5'-GTAAATCATGTTGGTGGCAGTCAATTGAACT-3') primers, cloned into a pCR2.1 TOPO cloning vector (Invitrogen) and sequenced (EurofinsDNA). A second PCR was performed using as primers SmAktFLRE-f (5'-CCgatccGTTATCGAGATTGCAGATTTCTGGG-3') and SmAktFLRE-r (5'-GCctcgagAAAATGTGTCACCAAACTATAACCAC-3') containing respectively *Bam*HI and *Xho*I restriction

sites and the fragment was inserted in frame in the pcDNA3.1-V5/His expression vector (Invitrogen). Site-directed mutagenesis was performed on the wild-type (WT) SmAkt construct to produce SmAkt E₁₁₇K and SmAkt L₁₅₀R active mutants using respectively the 5'-GGCTTATGAAACGCGCAAACATATTAATAAATTGGCGACG-3' and 5'-TAAAGATGATATGGCGCAACCTCGAAATAATTTACTGTTCGCG-3' mutated sequences and their reverse complement as primers.

2.6. Protein expression in *Xenopus oocytes*

cRNAs encoding SmAkt WT, E₁₁₇K and L₁₅₀R were synthesized *in vitro* using the T7 mMessage mMachine kit (Ambion) and the different SmAkt-pcDNA3.1-V5/His plasmids linearized by *SphI* as templates. cRNAs were injected in stage VI *Xenopus laevis* oocytes according to the procedure described previously (Vicogne et al., 2004). Each oocyte was injected with 60nL (60ng) of cRNA in the equatorial region and incubated at 19°C in ND96 medium (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM Hepes pH 7.4 supplemented with 50µg/mL Streptomycin/Penicillin, 225 µg/mL sodium pyruvate, 30 µg/mL trypsin inhibitor). For inhibitor assays, oocytes were incubated with compounds (A4-8) from the library I (Calbiochem®) at different concentrations. After 15 h, germinal vesicle breakdown (GVBD) was detected by the appearance of a white spot at the center of the animal pole of the oocyte.

2.7. Immunoprecipitation and western blot analyses

Expression and phosphorylation of SmAkt proteins in oocytes were confirmed by immunoprecipitation of oocyte lysates according to the procedure described previously (Vicogne et al., 2004). Following 15 h of expression, oocytes were lysed in buffer A (50 mM Hepes pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% SDS, 5 mM MgCl₂, 1 mg/mL bovine serum albumin, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL soybean trypsin inhibitor, 10 µg/mL benzamidine, 1 mM PMSF, 1 mM sodium vanadate) containing 0.5% Triton X-100 and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. Lysates were incubated with anti-V5 antibodies (1:100, Invitrogen) for 4 h 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 10% SDS-PAGE, then analyzed by Western blotting using anti-V5 (1:50,000) or anti-phospho-T₃₀₈ Akt (1:5,000; Upstate Biotechnology) antibodies. Mouse or rabbit Trueblot® secondary antibodies (eBioscience) were used as secondary antibodies and chemoluminescence was revealed using the advanced ECL detection system (Amersham Biosciences).

3. Results

3.1. Screening of the library of protein kinase inhibitors on adult worms

The InhibitorSelect™ 96-Well Protein Kinase Inhibitor Library I (Calbiochem) consists of eighty, well-characterized, cell-permeable, potent and reversible protein kinase inhibitors. Most of them are ATP-competitive. *S. mansoni* adult worm couples, freshly recovered from infected hamsters, were maintained in the culture conditions previously defined (Vanderstraete et al., 2013b), and we analyzed the level of male-female pairing and egg laying following 24, 48 or 72h of exposure to each inhibitor added at a 10µM final concentration. Results (Table S1) indicated a highly variable effect of each inhibitor on worms, ranging from a complete (100%) inhibition of pairing and/or egg laying at 24h to a totally unaffected, as compared to untreated parasites, worm behaviour following 72h of culture. A selection was made of the molecules that induced more or less profound alterations of pairing and/or egg laying of treated worms during 72h culture, and for which potential target kinases were already characterized in schistosomes (Table 1).

Compound	Pubchem ID	Deleterious effect on		Potential targets kinases in Schistosome	References
		Pairing	Egg laying		
Compound 56	2857	+	++	EGF-R	Dissous <i>et al.</i> , 2014a
EGFR/ErbB-2 Inhibitor	9843206	+/-	++		
EGFR Inhibitor	9549299	+	++		
EGFR/ErbB-2/ErbB-4 Inhibitor	11566580	-	++		
PD 158780	4707	++	++		
PD 174265	4709	-	+		
AG 1478	2051	-	+		
AG 1024	2044	++	++	IR / IGFR1-R	Vanderstraete <i>et al.</i> , 2013b
IGF-1R Inhibitor II	9549305	+	++		
SU11652	5329103	++	++	FGF-R	Hahnel <i>et al.</i> , 2014
Herbimycin A	16760502	++	++	Src	Knobloch <i>et al.</i> , 2006 Beckmann <i>et al.</i> , 2010 Beckmann <i>et al.</i> , 2011
Src Kinase Inhibitor I	1474853	-	+		
Flt-3 Inhibitor III	11772958	+	++	Src / Abl	
PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor IV	9797370	-	++	Src / Abl / Fyn	
PP1 Analog II, 1NM-PP1	5154691	+	++	Src / Fyn	
Syk Inhibitor	6419747	-	+	Syk	
Syk Inhibitor III	672296	++	++	Syk / Src	
TGF-β RI Inhibitor III	16079009	++	+/-	TGF-β R	Knobloch <i>et al.</i> , 2007
Chelerythrine Chloride	72311	++	++	PKC	Ludtmann <i>et al.</i> , 2009 Ressurreição <i>et al.</i> , 2014
Gö 6976	3501	+	+		
Gö 6983	3499	-	+		
PKCb Inhibitor	6419755	++	++		
Staurosporine, N-benzoyl-	16760627	++	++		
Staurosporine, Streptomyces sp.	451705	++	++		
PKCbII/EGFR Inhibitor	6711154	++	+/-		
Akt Inhibitor IV	5719375	++	++	Akt	
Akt Inhibitor X	16760284	++	++		
PDK1/Akt/Flt Dual Pathway Inhibitor	5113385	++	++		
Akt Inhibitor V (= Triciribine)	290486	-	-		
Akt Inhibitor VIII (= Akti1/2)	10196499	+/-	+/-		

Table 1. List of selected inhibitors that induce a significant effect on adult worm pairing and/or egg laying and their potential kinase targets in *S. mansoni*.

Inhibitors with a significant influence on adult worm physiology were selected and classified in this list according to their specific targets, and their putative kinases already identified in *S. mansoni* (see references). A scale of intensity of the action of each inhibitor on pairing and egg laying was defined as follows. For pairing, ++ indicates

that < 50% pairing is maintained at 24 h, + indicates < 50% at 48 h and +/- indicates < 50% of pairing at 72 h. For egg laying, ++ indicates a total number of eggs <10% of the eggs laid in controls during 72 h of culture, + indicates a number comprised between 10% and 30% and +/- a number comprised between 30% and 50%.

These potential targets include receptor (EGFR, FGFR and IR/IGFR) and cytosolic (Src, Abl, Fyn, Syk) tyrosine kinases as well as serine/threonine kinases (TGF- β R, PKC) known for their major functions in cell signaling and their importance in schistosome development. Indeed, most of these kinases have already been demonstrated to be druggable targets for parasites and many authors have shown the impact of their targeting on the viability and/or the reproduction of schistosomes (see references in Table 1). In this study, we found additionally that three Akt inhibitors contained in the library exerted a potent impairment of pairing and egg-laying and we decided to undertake the study of the *S. mansoni* Akt protein, in order to analyse its potential as a novel drug target for schistosomes.

3.2. Molecular cloning and structural characterization of SmAkt

Using tBLASTn analyses, a putative nucleotide coding sequence for *Schistosoma mansoni* Akt was identified in GenBank (XM_002578520.1). 5' and 3' UTR were determined with SmAkt encoding ESTs (AM042871.1, CF497410.2, AA169931.1 and CF498818.1). The complete nucleotide sequence of SmAkt was amplified by PCR from total cDNA of adult worms. Its open reading frame encodes a 586 amino acid protein with a predicted molecular weight of 67.8 kDa. Screening of *S. mansoni* genomic databases with the SmAkt cDNA sequence indicated the presence of a single *Akt* gene in the parasite. A single *Akt* gene has also been identified in other platyhelminth parasites (*Echinococcus*, *Hymenolepis*) (Tsai et al., 2013; Hemer et al., 2014) and in various insects (*Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*) (Andjelkovic et al., 1995; Riehle and Brown, 2003). However, multiple copies are present in vertebrate genomes and three different genes encode the Akt1, Akt2 and Akt3 proteins which are highly similar in sequence but have different functions in mammals (Hanada et al., 2004; Cohen, 2013). Phylogenetic analysis confirmed that SmAkt belongs to the Akt/PKB family, which is distinct from the two other PKA and PKC families of AGC kinases (Figure S1). SmAkt groups with trematode (*Clonorchis sinensis*) and cestode (*Echinococcus*, *Hymenolepis*) Akt proteins on a branch separate from that of vertebrate and insect Akt kinases. Sequence alignment of SmAkt with Akt proteins from various species illustrates the important conservation of these kinases (Fig. 1). Global identities between SmAkt and other Akt proteins range from 45 to 56%. SmAkt was found to be more similar to Akt1 than to Akt2 and Akt3 vertebrate proteins. As with the other members of the Akt family, SmAkt possesses a conserved (55 to 80% identity with others) N-terminal pleckstrin homology (PH) domain (AA 106-208) involved in the binding of 3-phosphoinositides and the recruitment of the protein to the membrane. The central S/T-type protein kinase domain (AA 244-501) is also highly conserved (68 to 75% identity with others) and contains the consensus D₃₈₅FG₃₈₇ triplet corresponding to the ATP-

binding domain as well as the conserved residue T₄₀₁ in the activation loop. In Akt proteins, phosphorylation of this residue by PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) stimulates enzymatic activity whereas additional phosphorylation by mTORC2 (mTOR complex 2) of a conserved serine residue in the C-terminal hydrophobic motif (HM) of the regulatory domain, increases the Akt activity (Sarbasov et al., 2005). This serine residue is present in SmAkt at the position S₅₆₅ inside of the conserved (F-X-X-F/Y-S/T-Y/F) HM sequence F₅₆₁EQFSF₅₆₆. In SmAkt, as in cestode and insect Akt proteins, an N-terminal extension precedes the PH domain. This poorly conserved sequence does not contain any known motifs; it is absent from vertebrate Akt proteins and its role is still unknown.

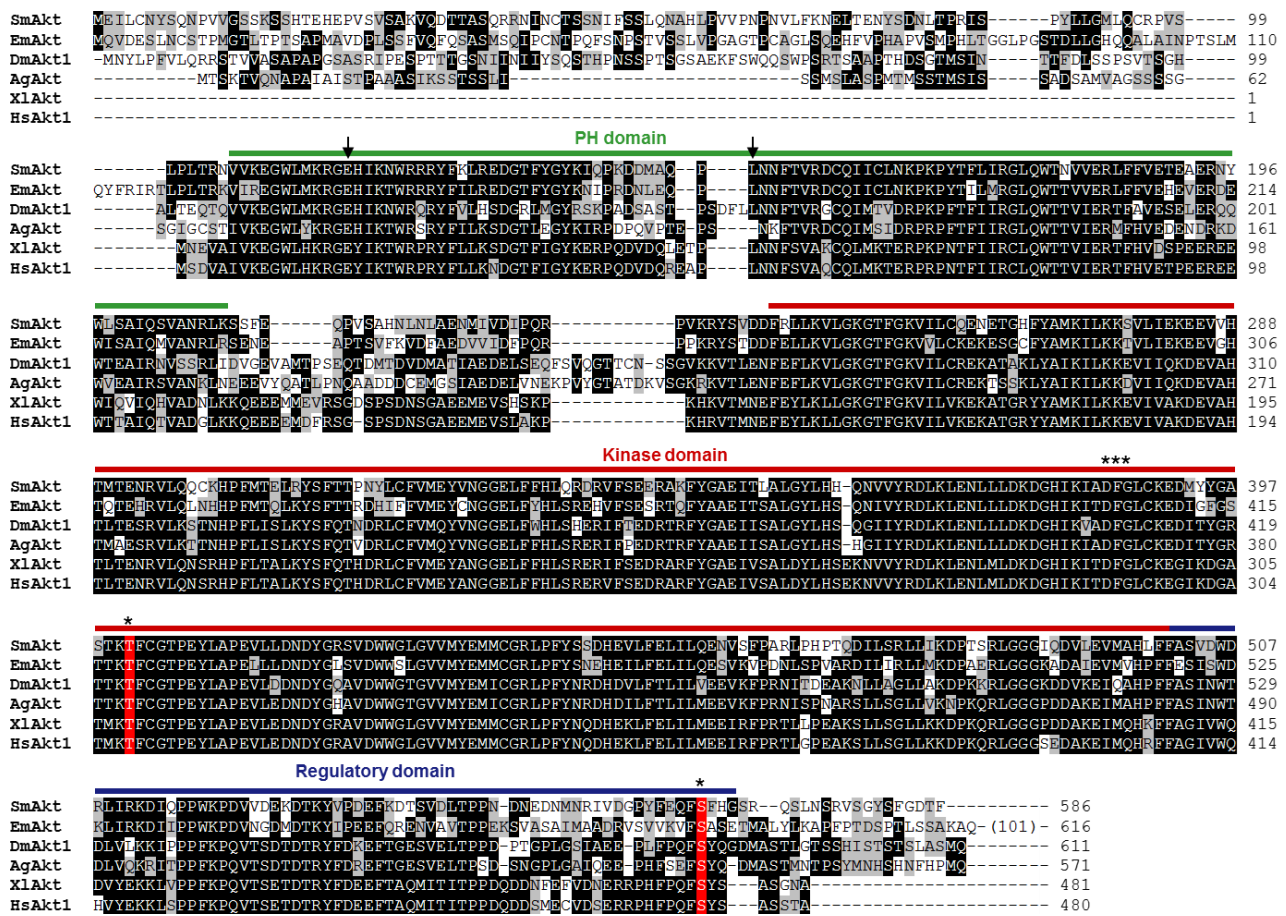


Fig. 1. Protein sequence alignment of SmAkt with Akt proteins from other species.

The SmAkt amino acid sequence was aligned using CLUSTAL W algorithm with Akt sequences from *Echinococcus multilocularis* (EmAkt: CCW28045.1), *Drosophila melanogaster* (DmAkt1: Q8INB9.3), *Anopheles gambiae* (AgAkt: XP_003436044.1), *Xenopus laevis* (XlAkt: AAG59601.1) and *Homo sapiens* (HsAkt1: AAL55732.1). Pleckstrin Homology (PH) domain is indicated in green, kinase domain (KD) in red and regulatory region in blue. Stars indicate conserved residues (DFG motif of the ATP binding site, threonine and serine phosphorylation sites) implicated in phosphorylating activity. Arrows indicated the PH domain residues (E₁₁₇ and L₁₅₀) involved in PH-KD interactions which maintain Akt kinases in inactive state.

3.3. Production of constitutively active mutants of SmAkt and kinase inhibition

Molecular modeling and structure-based studies have indicated that interactions between the PH and KD domains maintain the Akt protein in a closed inactive conformation (Calleja et al., 2007, 2009) (Fig. 2). In this closed conformation, PDK1 is unable to access and phosphorylate T₄₀₁ of SmAkt, until an upstream signal and PIP3 binding modifies this conformation and allows Akt phosphorylation and activation (Fig. 2). It has been shown that constitutive activation of Akt can result from mutations of residues at the interface between PH and KD domains. Particularly, the E₁₇K and L₅₂R mutations have been described in human cancers and such Akt1 somatic mutants are constitutively active, leading to oncogenic signaling (Parikh et al., 2012).

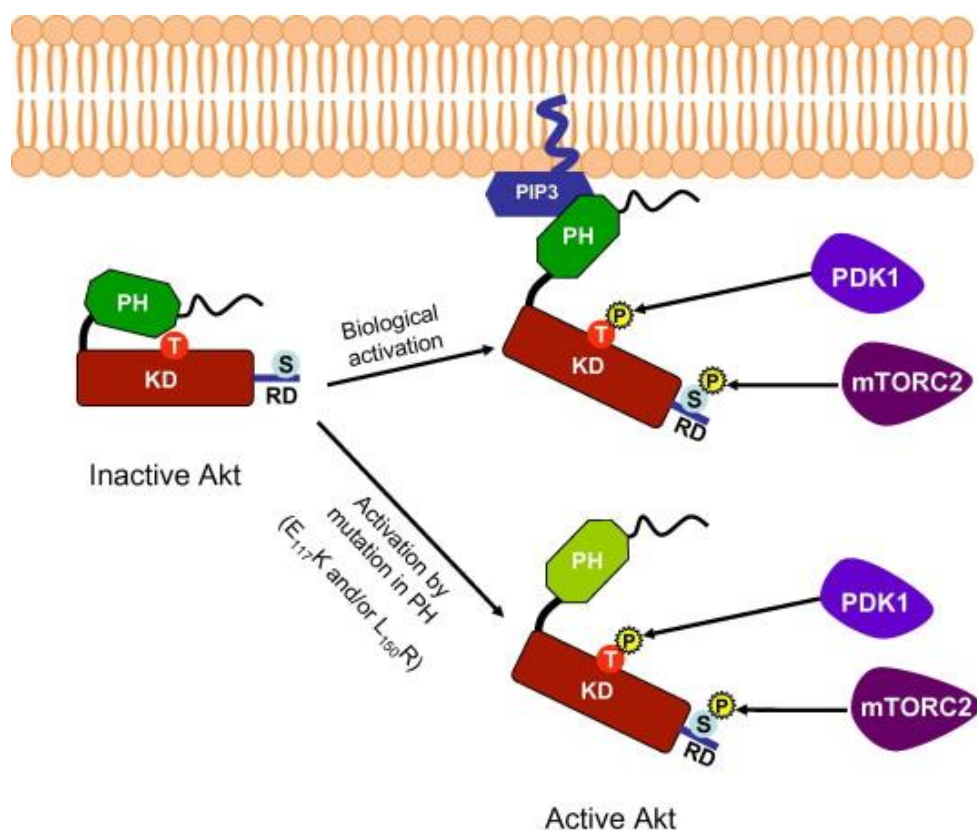


Fig. 2. Schematic representation of Akt activation.

Intramolecular interactions between PH and KD domains maintain Akt in an inactive conformation. Biological activation of Akt occurs by its targeting at the membrane and the binding of PH domain with PIP3 phospholipids which disrupts PH-KD interactions, unmasking the threonine (T) residue and allowing its phosphorylation by PDK1. Activation of Akt is reinforced by the phosphorylation of a second serine residue present in the C-terminal regulatory domain by mTORC2. Mutations of residues in the PH domain (E₁₁₇K and L₁₅₀R) in the SmAkt protein) disrupt interactions between PH and KD and lead to Akt activation. (PH: Pleckstrin Homology domain, KD: Kinase Domain, RD: Regulatory domain).

In the present study, we have analyzed the impact of the five Akt inhibitors contained in the InhibitorSelect™ library on the physiology of *S. mansoni* adult worms (see Table S1). Three of them were shown to considerably affect pairing and egg-laying of adult worms (Table 1). In order to correlate these effects to an inhibition of the kinase activity of SmAkt, we tested the five compounds (A4: Akt inhibitor IV, A5: Triciribine, A6: Akt inhibitor VIII, A7: Akt inhibitor X and A8: PDK1/Akt/Fit dual pathway inhibitor; see formulas in Table S2) on constitutively active mutants of SmAkt created by mutations of the conserved residues E₁₁₇ and L₁₅₀ of SmAkt, exactly as in human Akt1 oncogenic active mutants. SmAkt E₁₁₇K and SmAkt L₁₅₀R mutants were obtained by site-directed mutagenesis of the SmAkt wild-type sequence contained in the V5-pcDNA expression vector and their activity was monitored in the *Xenopus* oocyte model. We have already demonstrated that the *Xenopus* oocyte is a suitable model for expressing *S. mansoni* proteins and for studying phosphorylating activity of protein kinases (Vicogne et al., 2004). In stage VI oocytes, which are large cells blocked in prophase I of meiosis I, the expression of any active kinase triggers resumption of meiosis and induces Germinal Vesicle BreakDown (GVBD), a process easily detected by eye. Following injection of cRNAs and protein expression in oocytes, V5-tagged SmAkt WT, SmAkt E₁₁₇K and SmAkt L₁₅₀R proteins were immunoprecipitated by anti-V5 antibodies and detected in Western blots at a molecular weight of about 65kDa (Fig. 3A). Results in Fig. 3A also indicated that E₁₁₇K and L₁₅₀R mutations provoked the constitutive activation of SmAkt and its phosphorylation on the conserved T₄₀₁ residue, which is recognized by anti-phospho T₃₀₈ human Akt antibodies. As a result of their activity, expression of SmAkt E₁₁₇K and SmAkt L₁₅₀R proteins triggered meiosis resumption in oocytes monitored by GVBD (Fig. 3 A and B). In these experimental conditions, we analyzed the capacity of the five Akt inhibitors (A4-8), tested previously on adult worms, to inhibit resumption of meiosis in SmAkt E₁₁₇K or SmAkt L₁₅₀R –expressing oocytes. Results in Fig. 3B show that all the inhibitors when used at 10 μM final concentration are able to completely inhibit the phosphorylation of SmAkt mutants and their potential to induce GVBD. Levels of inhibition were further shown to be dose-dependent and to vary between the two Akt mutants. Globally, SmAkt L₁₅₀R appeared to be more sensitive than SmAkt E₁₁₇K to each inhibitor. All inhibitors, with the exception of A8, were already active on SmAkt L₁₅₀R at 1 μM decreasing GVBD levels to more than 60% and they could induce 100% inhibition at 5 μM, whereas the kinase activity of SmAkt E₁₁₇K was partially (30-50%) inhibited at 5 μM, with the exception of A4 where a total inhibition was obtained. These data confirmed the ability of A4, A5, A6, A7 and A8 molecules to inhibit the recombinant SmAkt kinase whereas both A5 and A6 molecules had no visible effects on adult worms.

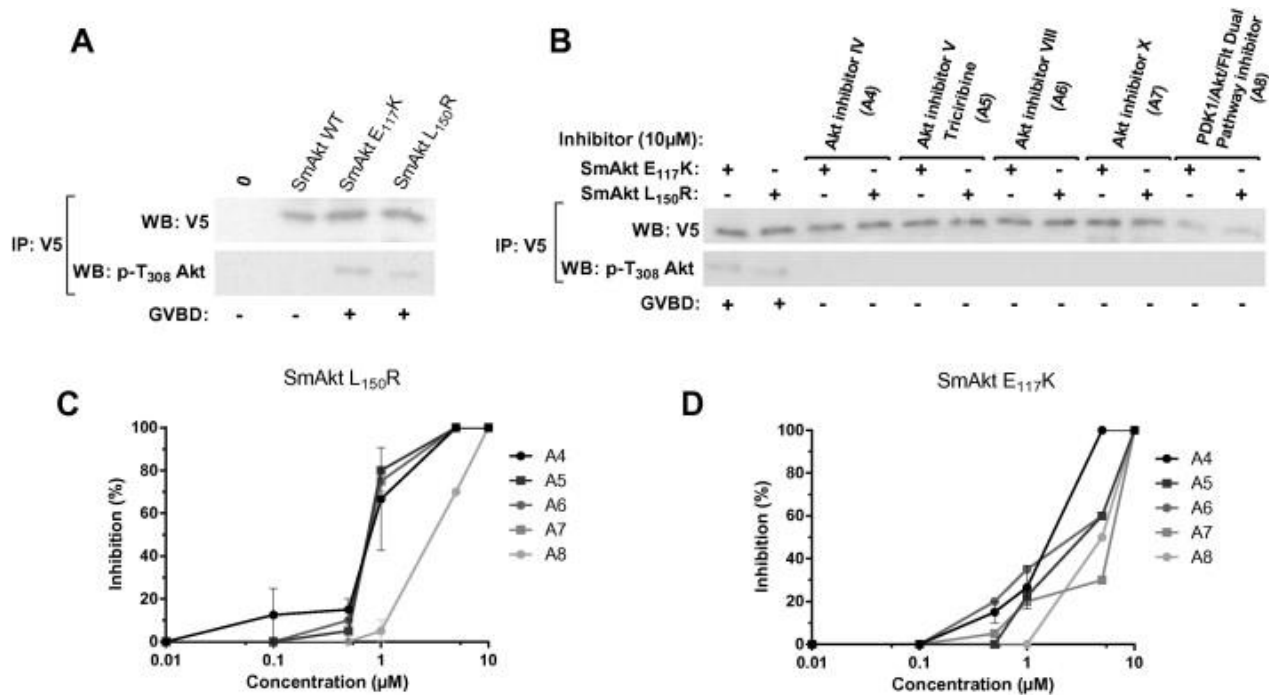


Fig. 3. Inhibition of constitutively active mutants of SmAkt expressed in *Xenopus* oocytes by Akt inhibitors.

(A) Western blot analysis of wild type, E₁₁₇K and L₁₅₀R V5-tagged SmAkt proteins expressed in *Xenopus* oocytes. Anti V5-immunoprecipitates were analyzed in Western blot with anti-V5 or with anti-pT₃₀₈ active Akt antibodies. SmAkt E₁₁₇K and L₁₅₀R active kinases are recognized by anti-pT₃₀₈ serum and are able to trigger meiosis resumption in oocytes (monitored by GVBD). (B) Oocytes expressing SmAkt E₁₁₇K or SmAkt L₁₅₀R were incubated with 10μM of each Akt inhibitor (A4-8). Anti V5-immunoprecipitates were analyzed as in (A). The five compounds inhibit phosphorylation and activity of SmAkt mutants. (C,D) Oocytes expressing SmAkt L₁₅₀R (C) or E₁₁₇K (D) were incubated with variable concentrations of Akt inhibitors (A4-8). For each condition, percentages of oocytes with GVBD were calculated and the results expressed in % of inhibition of maturation using as reference oocytes without inhibitor (mean ± SEM of three independent experiments).

3.4. Dose-dependent effect of Akt inhibitors on adult worm pairing *in vitro*

Results in Table S1 have shown that Triciribine (A5) and Akt inhibitor VIII (A6) had a very low impact on pairing and egg-laying by adult worms. At the opposite, A4, A7 and A8 compounds exerted a potent deleterious effect on adult worms when added at 10 μM in the culture medium, inhibiting totally worm pairing after 24 h of contact with drugs. A kinetic study was performed to measure the effect on schistosomes of these three inhibitors when used at concentrations varying from 10 nM to 10 μM. Results (Fig. 4) confirmed the complete (A4 and A8) and almost complete (A7) inhibition of pairing after 24 h at the maximal dose of 10 μM. Moreover they indicated a stronger effect of the A4 compound which still significantly (90%) inhibits worm pairing at 50nM after 48h whereas the two other compounds A7 and A8 did not have any effect at this dose even after 72 h. Results of egg counting were correlated with pairing data. Within 72 h of incubation no egg was laid by worms treated

with 100 nM of A4 while 5 μ M and 1 μ M of A7 and A8 compounds were respectively needed to block 100% egg laying (data not shown).

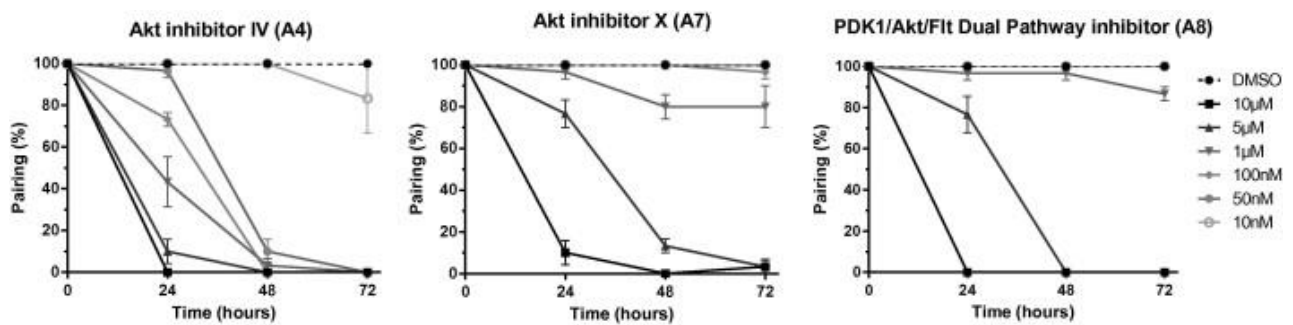


Fig. 4. Kinetic study of the influence of Akt inhibitors on adult worm pairing.

Freshly perfused paired worms (10 couples) were incubated for 72 h with increasing concentrations (10 nM to 10 μ M) of Akt inhibitor IV (A4), Akt inhibitor X (A7) and PDK1/Akt/Flt Dual Pathway inhibitor (A8). Controls were incubated with the same aliquot of DMSO solvent. The number of paired worms was determined at 24 h, 48 h and 72 h and results expressed in % of total worms (mean \pm SEM of three independent experiments).

3.5. Dose-dependent effect of Akt inhibitors on the viability of schistosomula larvae

Further experiments were performed to measure the impact of Akt inhibitors on the viability of *S. mansoni* larvae *in vitro*. One-day old schistosomula were cultured for 3 days with different concentrations of the Akt inhibitors and parasite death was assessed by loss of motility, tegument alterations and granular aspect, as in previous studies (Vanderstraete et al., 2013b). At 10 μ M concentration, we observed that A4, A7 and A8 compounds induced 100% mortality in schistosomula cultures after 2 days whereas A6 was less efficient at this period and A5 without any effect on schistosomula viability at 72 h (Fig. S2). In a kinetic study, similar to that performed on adult worms, we analyzed the effect of A4, A7 and A8 on schistosomula survival, using 50 nM to 10 μ M doses. Results in Fig. 5 indicated that A8 was the most efficient compound towards schistosomula. At 1 μ M, 100% of schistosomula were killed at 24 h with A8 whereas only 50% and 30% parasites were killed after 72 h with this dose of A7 and A4 respectively. The compound A8 induced 50% mortality at 72 h at 50 nM, a concentration which is for A4 and A7 almost inactive at this time period on schistosomula viability.

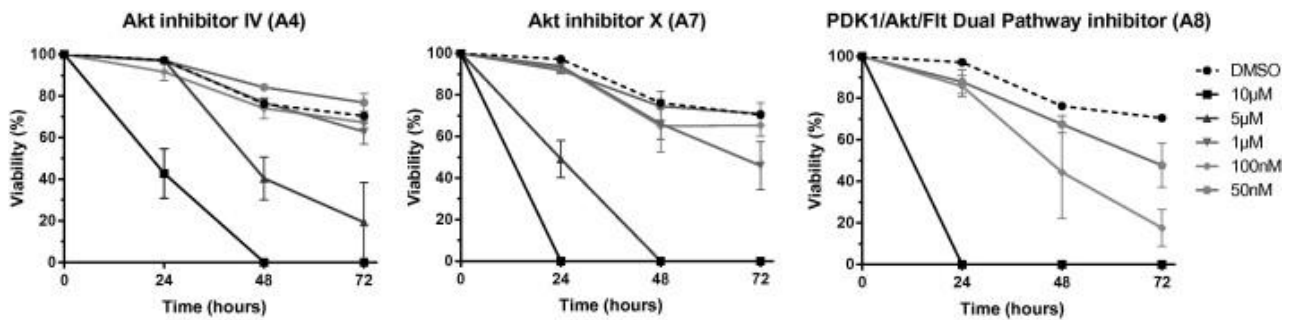


Figure 5: Kinetic study of the influence of Akt inhibitors on schistosomula viability.

S. mansoni schistosomula were incubated with different concentrations (50 nM to 10 μM) of Akt inhibitor IV (A4), Akt inhibitor X (A7) and PDK1/Akt/Flt Dual Pathway inhibitor (A8). Percentages of alive schistosomula were determined under microscope at 24 h, 48 h and 72 h. Results are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments.

4. Discussion and conclusion

Protein kinases are highly conserved molecules that play key roles in the activation of many signaling pathways initiated by external signals. They are involved in many biological processes such as cell growth, proliferation and differentiation. In schistosomes, PKs have been shown to play major roles in development and reproduction processes (Beckmann et al., 2012; Dissous et al., 2014a). Targeting of diverse PKs was shown to affect reproductive biology of parasites, as well as survival of adult worm and/or schistosomula *in vitro*, supporting the hypothesis that PK inhibitors are potential chemotherapeutics against schistosomiasis (Dissous and Grevelding, 2011).

In this context, we have extended the research of novel anti-schistosome drugs by screening the InhibitorSelect™ 96-Well Protein Kinase Inhibitor Library I (Calbiochem) and by analysing their impact on *S. mansoni* worm pairing and egg laying *in vitro*. Most of these PK inhibitors are ATP-competitive and are directed against a large variety of kinases including receptor and soluble STKs or TKs. First results indicated a highly variable effect of these molecules on the parasite, some of them causing a total inhibition of pairing and egg laying while others had no obvious effect on the general worm physiology. Decrease of the level of pairing was in most cases associated with inhibition of egg laying, but in some cases (particularly with EGFR but also with GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) and Aurora inhibitors), egg laying was profoundly affected while worm pairing was maintained, suggesting that the targeted kinases were preferentially involved in gamete production. While the role of EGFR in oogenesis and fertilization are well-known (Sundaram, 2006; Cheung et al., 2011), the functions of GSK3 in these processes are not clearly established. However, different studies have reported the role of GSK3 in oocyte maturation dependent on insulin signaling (Uzbekova et al., 2009; Acevedo et al., 2007) and the demonstration that HyGSK3 of *Hydra vulgaris* is overexpressed during oogenesis and

spermatogenesis and that the inhibition of its kinase activity stops sexual reproduction in *Hydra* (Rentzsch et al., 2005), supports the hypothesis that GSK3 is important for reproduction of schistosomes. Similarly, the function of Aurora kinases is essential in mitosis and cell proliferation (Marumoto et al., 2003) and this could explain the important effect of Aurora inhibitors on schistosome egg laying.

Of the PK inhibitors identified in this work for their activity on adult parasites, many have been shown to target specific TK molecules, and particularly TKs for which schistosome homologs were already highlighted for their role in development and reproduction. Indeed, we confirmed here the efficacy of tyrphostin AG1024, a potent inhibitory compound towards *S. mansoni* insulin and VKR receptors which provoked alterations of reproductive organs, and killed adult worms within 48 h at 10 μ M (Vanderstraete et al., 2013b). Tyrphostin AG1478, already shown to inhibit SER but also SmVKR1 (Vanderstraete et al., 2013b), reduced considerably the number of laid eggs (16% of control) but as mentioned above it did not affect significantly worm pairing. Recently, SmFGFR-A/B were described for their potential roles in gonad differentiation and reproduction. BIBF1120, a potent triple inhibitor for FGFR, VEGFR and PDGFR affected the viability of adult worms and provoked changes in gonad morphology and a drastic decline of mitotically active cells in testes (Hahnel et al., 2014). In this study, the ATP competitive inhibitor SU11652, which targets FGFR, VEGFR and PDGFR similarly to BIBF1120, also had a drastic effect on pairing and egg laying. Three soluble TKs have been shown to contribute to RTK signaling in schistosomes, SmTK3 (Src-like), SmTK4 (Syk-like) and SmTK6 (Src/Abl-like). The potential of Herbimycin, a Src-specific inhibitor, able to reduce mitotic activity and egg production in female worms (Knobloch et al., 2006) was confirmed in this work by its effect on pairing and egg laying, supporting the role of SmTK3 in the control of fecundity (Kapp et al., 2004). Inhibition of SmTK4 by Syk inhibitors provoked a decrease of egg laying, similar to that observed previously with another Syk inhibitor, Piceatannol (Beckmann et al., 2010). The Syk inhibitor III, which is active both on Syk and Src, was the most efficient on inhibition of pairing and egg laying, probably by its dual effect on both kinases. Other compounds targeting more than one CTKs exerted also a strong inhibitory effect on egg laying, supporting the importance of TK signaling in reproductive activities of schistosomes. Besides these TK enzymes, S/T kinases are fundamental for survival and reproductive function in schistosomes. The strong effect of the TGF β R1 inhibitor III on pairing here confirms the major role of TGF β signaling in worm pairing and fertility already observed by the use of the T β RI serine/threonine kinase inhibitor (TRIKI) and the demonstration of its deleterious effect on vitelline cell mitotic activity and egg production in female worms (Knobloch et al., 2007; Buro et al., 2013). The PKC inhibitor GF109203X was recently shown to inhibit worm pairing and egg output (Ressurreição et al., 2014). Several other

PKC inhibitory compounds were tested in this study and their deleterious effect on adult worms confirmed the importance of PKC in *S. mansoni* physiology and reproduction.

Additionally, anti-Akt compounds were identified for their potent inhibitory action on pairing and egg laying, and this prompted us to investigate on SmAkt and to study its sensitivity to these inhibitors. Akt (or PKB) proteins belong to the PKA, PKG and PKC (AGC) superfamily of S/T kinases. Akt mediates a variety of physiological responses, including promotion of cell survival and inhibition of apoptosis (Brazil et al., 2004). In mammals, the Akt family consists of three members Akt1, Akt2 and Akt3. Akt1 plays a crucial role in tumorigenesis and is involved in cellular survival pathways, by inhibiting apoptosis and inducing protein synthesis. Akt2 is an important signaling molecule in the insulin signaling pathway, involved in glucose transport and Akt3 is preferentially active in brain (Hanada et al., 2004). In most invertebrates, a single Akt molecule is present, and a single gene encoding a protein homologous to Akt was found in *S.mansoni* genome databases (Berriman et al., 2009). Phylogenetic analysis confirmed that the protein SmAkt groups with other vertebrate and invertebrate Akt/PKB proteins on a branch distinct from those of PKA and PKC members. SmAkt is close to Akt proteins from other platyhelminths and its protein structure is highly conserved. SmAkt shares with others the domains which are essential for its kinase activity, ie the pleckstrin homology (PH) domain for binding PI(3,4,5)P in membranes and the conserved kinase domain containing an ATP binding motif (D₃₈₅FG₃₈₇) and the two conserved phosphorylation sites T₄₀₁ and S₅₆₅ required for its activation by upstream kinases. Similarly to other invertebrate proteins, SmAkt contains a divergent N-terminal extension (of about 100 AA) located upstream from the PH domain and which is not found in vertebrate Akt proteins. In *D. melanogaster*, splicing variants of the single *DmAkt* gene can generate two proteins differing by the presence or not of the first 81 residues composing this extension sequence (Andjelkovic et al., 1995). It is conceivable that similar variants of Akt could exist in other species, and particularly in *S. mansoni*. To our knowledge, a possible incidence of this extra sequence in differential activities of DmAkt isoforms was not shown.

The PH domain of Akt plays a significant role in recognition by upstream kinases since it acts as an inhibitor of phosphorylation of T₃₀₈ of human Akt by masking this residue from PDK1. Intramolecular interactions between PH domain-Kinase domain (KD) maintain Akt in an inactive conformation and it has been shown that destabilizing interdomain contacts results in constitutive activation of Akt in human cancers. E₁₇K and L₅₂R mutations in the PH domain of Akt found in human cancers generate constitutively active Akt mutants. Two-hybrid assays using mutated Akt PH and wild type KD constructs have confirmed that PH mutants were deficient in PH-KD interaction (Parikh et al., 2012). As human E₁₇ and L₅₂ residues are conserved respectively at positions 117 and 150 in SmAkt, we generated by site-directed mutagenesis E₁₁₇K and L₁₅₀R SmAkt mutants. Effectively, both mutated

proteins (but not wild-type Akt) were shown to be spontaneously active when expressed in *Xenopus* oocyte and they were further used in inhibition assays to test anti-Akt compounds on their activity. The five Akt inhibitors contained in the library were shown to inhibit (when used at 10 μ M) 100% of the capacity of E₁₁₇K and L₁₅₀R SmAkt mutants to be phosphorylated and to induce oocyte maturation. However, as the mode of action on Akt differs significantly for each Akt inhibitor, and specially that some of them like A4 and A8 have also an activity on the upstream kinase PDK1, these results only indicated that the five Akt inhibitors were active on the Akt pathway, by direct or indirect inhibition of the Akt enzyme. Indeed, if A5, A6 and A7 are selective for Akt (Yang et al., 2004; Barnett et al., 2005; Thimmaiah et al., 2005), A4 and A8 are known to also target Akt upstream kinases such as PDK1 (Kau et al., 2003; Zeng et al., 2006) and could as well inhibit Akt activity by this way. A putative Ser/Thr kinase similar to PDK1 is present in the *S. mansoni* genome (CAZ 36594) (Protasio et al., 2012) susceptible to participate to the PI3K/Akt pathway in schistosomes. Thus, these data confirmed the high conservation of SmAkt with other Akt proteins and the possibility to target SmAkt pathway with these compounds in living parasites.

During initial screening of the library on adult worms, we noticed that only three out of the five Akt inhibitors reduced at 10 μ M worm pairing and egg laying. The five anti-Akt molecules were classified as cell permeable by the manufacturer, and it was difficult to know whether the inefficiency of Triciribine (A5) and Akt inhibitor VIII (A6) resulted from the limited permeability or from the instability of the molecules in culture medium. Kinetic studies made to compare the efficacy of A4, A7 and A8 on adult schistosomes confirmed complete (for A4 and A8) and almost complete (for A7) inhibition of worm pairing as soon as 24 h at 10 μ M. The A4 compound appeared to be the most active on adult worms, since it remained highly efficient at 50 nM after 48 h whereas the two other compounds A7 and A8 had no more activity at this dose. As for adult parasites, A4, A7 and A8 were the most toxic compounds on schistosomula, able to kill 100% of larvae within 2 days at 10 μ M whereas the toxicity of A6 was limited and A5 was totally inefficient on this parasite stage. Interestingly, the most active compound on schistosomula was A8 and not A4 as on adult worms. A8 was able to kill 50% of schistosomula within 3 days at 50 nM whereas A4 and A7 had no activity at this dose. Again, it is difficult to explain the stronger effect of A8 on larvae compared to A4 and A7, but its PDK1/Akt/Flt dual pathway inhibitory action (Zeng et al., 2006) might reinforce its lethal activity towards parasite larvae.

Akt/PKB is a downstream target of many RTKs and a central player at the crossroads of many metabolic pathways activated in response to growth factors and primarily to insulin. We have previously demonstrated the importance of VKR and insulin-like receptor signaling in the reproductive activities of schistosomes and the capacity of VKR to activate the PI3K/Akt pathway has been confirmed

in the model of *Xenopus* oocytes (Vanderstraete et al., 2014). Preliminary experiments (results not shown) have indicated that the targeting of SmAkt by RNA interference in adult worms induced phenotypes similar to those observed in parasites interfered for SmVKR, showing important morphological changes in female worms, with a disorganization of the ovary and a defect of egg formation (Vanderstraete et al., 2014). In insects, insulin pathway and particularly its most positive regulator the Akt kinase, have been shown to directly participate in reproductive processes in dipterans (Riehle and Brown, 2003) and in hymenopterans (Okada et al, 2010). In this study, we have shown that bisindolylmaleimide I, which targets and inhibits GSK3, the major substrate of Akt demonstrated to contribute to gametogenesis (Rentzsch et al., 2005), also stopped egg laying in schistosomes. Altogether, these data strongly suggest that SmAkt, situated at the junction of diverse essential signaling pathways, acts as a key regulator of reproduction processes in schistosomes, and that it represents a novel interesting drug target for schistosomiasis control. Further structure-based activity studies are now needed to improve our knowledge of SmAkt and to design parasite-specific molecules that could be used for the development of novel chemotherapies.

Acknowledgments

This research was supported by the Institut de la Sante et de la Recherche Medicale, University Lille 2, France. M.M and MV fellowships were from the Ministere de l'Education Nationale et de la Recherche, France. We declare that no conflict of interest exists.

References

- Acevedo, N., Ding, J., Smith, G.D., 2007. Insulin signaling in mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 77, 872-879.
- Ahier, A., Khayath, N., Vicogne, J., and Dissous, C., 2008. Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite* 15, 573-579
- Ahier, A., Rondard, P., Gougnard, N., Khayath, N., Huang, S., Trolet, J., Donoghue, D.J., Gauthier, M., Pin, J.P., Dissous, C., 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: e5651. doi: 10.1371/journal.pone.0005651
- Andjelkovic, M., Jones, P.F., Grossniklaus, U., Cron, P., Schier, A.F., Dick, M., Bilbe, G., Hemmings, B.A., 1995. Developmental regulation of expression and activity of multiple forms of the *Drosophila* RAC protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 4066-4075
- Andrade, L., Nahum, L.A., Avelar, L.G.A., Silva, L.L., Zerlotini, A., Ruiz, J.C., Oliveira, G., 2011. Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics* 12, 215-234. doi: 10.1186/1471-2164-12-215
- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., Saya, H., 2003. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 278, 51786-51795.
- Avelar, L.G.A., Nahum, L.A., Andrade, L.F., Oliveira, G., 2011. Functional diversity of the *Schistosoma mansoni* tyrosine kinases. *J. Signal Transduct.* 603290. doi: 10.1155/2011/603290
- Barnett, S.F., Defeo-Jones, D., Fu, S., Hancock, P.J., Haskell, K.M., Jones, R.E., Kahana, J.A., Kral, A.M., Leander, K., Lee, L.L., Malinowski, J., McAvoy, E.M., Nahas, D.D., Robinson, R.G., Huber, H.E., 2005. Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J.* 385, 399-408. doi: 10.1042/BJ20041140
- Beckmann, S., and Grevelding, C.G., 2010. Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro. *Int. J. Parasitol.* 40: 521-526. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.01.007
- Beckmann, S., Buro, C., Dissous, C., Hirzmann, J., Grevelding, C.G., 2010. The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. *PLoS Pathog.* 6: e1000769. doi:10.1371/journal.ppat.1000769
- Beckmann, S., Hahnel, S., Cailliau, K., Vanderstraete, M., Browaeys, E., Dissous, C., Grevelding, C.G., 2011. Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 286, 42325-42336. doi: 10.1074/jbc.M110.210336
- Beckmann, S., Leutner, S., Gougnard, N., Dissous, C., Grevelding, C.G., 2012. Protein kinases as potential targets for novel anti-schistosomal strategies. *Curr. Pharm. Des.* 18, 3579-3594.
- Berriman, M., Haas, B.J., LoVerde, P.T., Wilson, R.A., Dillon, G.P., Cerqueira, G.C., Mashiyama, S.T., Al Lazikani, B., Andrade, L.F., Ashton, P.D., Aslett, M.A., Bartholomeu, D.C., Blandin, G., Caffrey, C.R., Coghlan, A., Coulson, R., Day, T.A., Delcher, A., DeMarco, R., Djikeng, A., Eyre, T., Gamble, J.A., Ghedin, E., Gu, Y., Hertz-Fowler, C., Hirai, H., Hirai, Y., Houston, R., Ivens, A., Johnston, D.A., Lacerda,

D., Macedo, C.D., McVeigh, P., Ning, Z., Oliveira, G., Overington, J.P., Parkhill, J., Perteza, M., Pierce, R.J., Protasio, A.V., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Sajid, M., Salzberg, S.L., Stanke, M., Tivey, A.R., White, O., Williams, D.L., Wortman, J., Wu, W., Zamanian, M., Zerlotini, A., Fraser-Liggett, C.M., Barrell, B.G., El Sayed, N.M., 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. 460, 352-358. doi: 10.1038/nature08160

Brazil, D.P., Yang, Z.Z., Hemmings, B.A. 2004. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.* 29, 233-242. doi: 10.1016/j.tibs.2004.03.006.

Buro, C., Oliveira, K.C., Lu, Z., Leutner, S., Beckmann, S., Dissous, C., Cailliau, K., Verjovski-Almeida, S., Grevelding, C.G., 2013. Transcriptome analyses of inhibitor-treated schistosome females provide evidence for cooperating Src-kinase and TGF β receptor pathways controlling mitosis and eggshell formation. *PLoS Pathog.* 9:e1003448. doi: 10.1371/journal.ppat.1003448

Buro, C., Beckmann, S., Oliveira, K.C., Dissous, C., Cailliau, K., Marhöfer, R.J., Selzer, P.M., Verjovski-Almeida, S., Grevelding, C.G., 2014. Imatinib treatment causes substantial transcriptional changes in adult *Schistosoma mansoni* in vitro exhibiting pleiotropic effects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2923. doi: 10.1371/journal.pntd.0002923.

Calleja, V., Alcor, D., Laguerre, M., Park, J., Vojnovic, B., Hemmings, B.A., Downward, J., Parker, P.J., Larijani, B., 2007. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation *in vivo*. *PLoS Biol.* 5:e95. doi: 10.1371/journal.pbio.0050095

Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P.J., Larijani, B., 2009. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol.* 7:e17. doi: 10.1371/journal.pbio.1000017.

Cheung, L.S., Schüpbach, T., Shvartsman, S.Y., 2011. Pattern formation by receptor tyrosine kinases: analysis of the Gurken gradient in *Drosophila* oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 719-725.

Cohen, M.M. Jr. 2013. The AKT genes and their roles in various disorders. *Am. J. Med. Genet. A.* 161A: 2931-2937. doi: 10.1002/ajmg.a.36101.

Colley, D.G., Bustinduy, A.L., Secor, W.E., King, C.H., 2014. Human schistosomiasis. *Lancet*. 383, 2253-2264. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61949-2.

DeMarco, R., Verjovski-Almeida, S., 2009. Schistosomes--proteomics studies for potential novel vaccines and drug targets. *Drug Discov. Today*. 14, 472-478. doi: 10.1016/j.drudis.2009.01.011.

Dissous, C., Dissous, C., Capron, A., 1981. Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol Biochem Parasitol.* 3, 215-225. doi: 10.1016/0166-6851(81)90053-0

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

Dissous, C., Ahier, A., Khayath, N., 2007. Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *Bioessays* 29, 1281-1288. doi: 10.1002/bies.20662

Dissous, C., Grevelding, C.G., 2011. Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective? *Trends Parasitol.* 27, 59-66. doi: 10.1016/j.pt.2010.09.001

Dissous, C., Vanderstraete, M., Beckmann, S., Gouignard, N., Leutner, S., Buro, C., Grevelding, C.G., 2014a. "Receptor Tyrosine kinase signaling and drug targeting in schistosomes" in Protein phosphorylation in parasites: novel targets for antiparasitic intervention, ed. C. Doerig, G. Späth, M. Wiese (Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KgaA, Weinheim), pp. 337-356

Dissous, C., Morel, M., Vanderstraete, M., 2014b. Venus Kinase Receptors: prospects in signaling and biological functions of these invertebrate receptors. *Front. Endocrinol.* 5, 72. doi: 10.3389/fendo.2014.00072

Doenhoff, M.J. 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.

Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: Mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 659-667. doi: 10.1097/QCO.0b013e328318978f

Gouignard, N., Vanderstraete, M., Cailliau, K., Lescuyer, A., Browaeys, E., Dissous, C., 2012. *Schistosoma mansoni*: structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. *Exp. Parasitol.* 132, 32-39. doi: 10.1016/j.exppara.2011.05.007

Hahnel, S., Quack, T., Parker-Manuel, S. J., Lu, Z., Vanderstraete, M., Morel, M., Dissous, C., Cailliau, K., Grevelding, C.G., 2014. Gonad RNA-specific qRT-PCR analyses identify genes with potential functions in schistosome reproduction such as SmFz1 and SmFGFRs. *Front. Genet.* 5:170. doi: 10.3389/fgene.2014.00170

Hanada, M., Feng, J., Hemmings, B.A., 2004. Structure, regulation and function of PKB/AKT- a major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta* 1697, 3-16.

Hemer, S., Konrad, C., Spiliotis, M., Koziol, U., Schaack, D., Förster, S., Gelmedin, V., Stadelmann, B., Dandekar, T., Hemphill, A., Brehm, K., 2014. Host insulin stimulates *Echinococcus multilocularis* insulin signalling pathways and larval development. *BMC Biol.* 12:5. doi: 10.1186/1741-7007-12-5.

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

Johnson, L.N., 2009. Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Q. Rev. Biophys.* 42, 1-40.

Kapp, K., Knobloch, J., Schussler, P., Sroka, S., Lammers, R., Kunz, W., Grevelding, C.G., 2004. The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 171-182. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.07.010

Kau, T.R., Schroeder, F., Ramaswamy, S., Wojciechowski, C.L., Zhao, J.J., Roberts, T.M., Clardy, J., Sellers, W.R., Silver, P.A., 2003. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell.* 4, 463-476. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00303-9

Khayath, N., Vicogne, J., Ahier, A., Ben Younes, A., Konrad, C., Trolet, J., Viscogliosi, E., Brehm, K., Dissous, C., 2007. Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Febs J.* 274, 659-676. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05610.x

Knobloch, J., Winnen, R., Quack, M., Kunz, W., Grevelding, C.G., 2002. A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* 294, 87-97. doi: 10.1016/S0378-1119(02)00760-6

Knobloch, J., Kunz, W., Grevelding, C.G., 2006. Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 36, 1261-1272. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.06.004

Knobloch, J., Beckmann, S., Burmeister, C., Quack, T., Grevelding, C.G., 2007. Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 117, 318-336. doi: 10.1016/j.exppara.2007.04.006

Kumar, C.C., Madison, V., 2005. Akt crystal structure and Akt-specific inhibitors. *Oncogene* 24, 7493–7501. doi:10.1038/sj.onc.1209087.

Leutner, S., Beckmann, S., Grevelding, C.G. 2011. Characterization of the cGMP-dependent protein kinase SmcGK1 of *Schistosoma mansoni*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 83, 637-648.

Long, T., Cailliau, K., Beckmann, S., Browaeys, E., Trolet, J., Grevelding, C.G., Dissous, C. 2010. *Schistosoma mansoni* Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction. *Int. J. Parasitol.* 40, 1075-1086. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.03.002.

LoVerde, P.T., Osman, A., and Hinck, A.P., 2007. *Schistosoma mansoni*: TGF- β signaling pathways. *Exp. Parasitol.* 117, 304-317. doi: 10.1016/j.exppara.2007.06.002.

LoVerde, P.T., Andrade, L.F., Oliveira, G., 2009. Signal transduction regulates schistosome reproductive biology. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 422-428. doi: 10.1016/j.mib.2009.06.005

Ludtmann, M.H., Rollinson, D., Emery, A.M., Walker, A.J., 2009. Protein kinase C signalling during miracidium to mother sporocyst development in the helminth parasite, *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 39, 1223-1233. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.04.002.

Melman, S.D., Steinauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., Loker, E.S. 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 3:e504. doi: 10.1371/journal.pntd.0000504.

Morel, M., Vanderstraete, M., Hahnel, S., Grevelding, C.G., Dissous, C., 2014. Receptor tyrosine kinases and schistosome reproduction: new targets for chemotherapy. *Front. Genet.* 5:238. doi: 10.3389/fgene.2014.00238.

Okada, Y., Miyazaki, S., Miyakawa, H., Ishikawa, A., Tsuji, K., Miura, T., 2010. Ovarian development and insulin-signaling pathways during reproductive differentiation in the queenless ponerine and *Diacamma* sp. *J. Insect. Physiol.*, 56, 288-295. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.10.013.

Pal, S.K., Reckamp, K., Yu, H., Figlin, R.A., 2010. Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 1355–1366. doi:10.1517/13543784.2010.520701

Parikh, C., Janakiraman, V., Wu, W.I., Foo, C.K., Kljavin, N.M., Chaudhuri, S., Stawiski, E., Lee, B., Lin, J., Li, H., Lorenzo, M.N., Yuan, W., Guillory, J., Jackson, M., Rondon, J., Franke, Y., Bowman, K.K., Sagolla, M., Stinson, J., Wu, T.D., Wu, J., Stokoe, D., Stern, H.M., Brandhuber, B.J., Lin, K., Skelton, N.J., Seshagiri, S., 2012. Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 19368-19373. doi: 10.1073/pnas.1204384109.

Pica-Mattoccia, L., Doenhoff, M.J., Valle, C., Basso, A., Troiani, A.R., Liberti, P., Festucci, A., Guidi, A., Cioli, D. 2009. Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 111, 82-85. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.01.012.

Protasio, A.V., Tsai, I.J., Babbage, A., Nichol, S., Hunt, M., Aslett, M.A., De Silva, N., Velarde, G.S., Anderson, T.J., Clark, R.C., Davidson, C., Dillon, G.P., Holroyd, N.E., Loverde, P.T., Lloyd, C., McQuillan, J., Oliveira, G., Otto, T.D., Parker-Manuel, S.J., Quail, M.A., Wilson, R.A., Zerlotini, A., Dunne, D.W., Berriman, M. 2012. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1455. doi:10.1371/journal.pntd.0001455

Rentzsch, F., Hobmayer, B., Holstein, T.W., 2005. Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in Hydra gametogenesis. *Dev. Biol.* 278, 1-12.

Ressurreição, M., De Saram, P., Kirk, R.S., Rollinson, D., Emery, A.M., Page, N.M., Davies, A.J., Walker, A.J., 2014. Protein Kinase C and Extracellular Signal-Regulated Kinase Regulate Movement, Attachment, Pairing and Egg Release in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(6):e2924. doi: 10.1371/journal.pntd.0002924

Riehle, M.A., Brown, M.R., 2003. Molecular analysis of the serine/threonine kinase Akt and its expression in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 12, 225-232.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307:1098-1101. doi: 10.1126/science.1106148

Strebhardt, K. 2010. Multifaceted polo-like kinases: Drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 643–660.

Sundaram, M.V., 2006. RK/Ras/MAPK signaling. *Wormbook*, 11, 1-19.

Swierczewski, B.E., Davies, S.J. 2009. A schistosome cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is essential for parasite viability. *PLoS Negl Trop Dis.* 3:e505. doi: 10.1371/journal.pntd.0000505.

Swierczewski, B.E., Davies, S.J. 2010. Developmental regulation of protein kinase A expression and activity in *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 40: 929-935. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.01.001.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28, 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121

Thimmaiah, K.N., Easton, J.B., Germain, G.S., Morton, C.L., Kamath, S., Buolamwini, J.K., Houghton, P.J. 2005. Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 31924-31935. doi: 10.1074/jbc.M507057200

Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciutto, E., Aslett, M., Beasley, H., Bennett, H.M., Cai, J., Camicia, F., Clark, R., Cucher, M., De Silva, N., Day, T.A., Deplazes, P., Estrada, K., Fernández, C., Holland, P.W., Hou, J., Hu, S., Huckvale, T., Hung, S.S., Kamenetzky, L., Keane, J.A., Kiss, F., Koziol, U., Lambert, O., Liu, K., Luo, X., Luo, Y., Macchiaroli, N., Nichol, S., Paps, J., Parkinson, J., Pouchkina-Stantcheva, N., Riddiford, N., Rosenzvit, M., Salinas, G., Wasmuth, J.D., Zamanian, M., Zheng, Y.; Taenia solium Genome Consortium, Cai, X., Soberón, X., Olson, P.D., Lactetten J.P., Brehm, K., Berriman, M., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature.* 496, 57-63. doi: 10.1038/nature12031.

Uzbekova, S., Salhab, M., Perreau, C., Mermillod, P., Dupont, J., 2009. Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: possible involvement in meiosis during in vitro maturation. *Reproduction*, 138, 235-246.

Vanderstraete, M., Gouignard, N., Ahier, A., Morel, M., Vicogne, J., Dissous, C., 2013a. The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. *BMC Genomics* 14, 361. doi: 10.1186/1471-2164-14-36.

Vanderstraete, M., Gouignard, N., Cailliau, K., Morel, M., Lancelot, J., Bodart, J.F., and Dissous, C., 2013b. Dual targeting of insulin and venus kinase Receptors of *Schistosoma mansoni* for novel anti-schistosome therapy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2226. doi:10.1371/journal.pntd.0002226

Vanderstraete, M., Gouignard, N., Cailliau, K., Morel, M., Hahnel, S., Leutner, S., Beckmann, S., Grevelding, C.G., Dissous, C., 2014. Venus Kinase Receptors control reproduction in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 10:e1004138. doi: 10.1371/journal.ppat.1004138

Vicogne, J., Pin, J.P., Lardans, V., Capron, M., Noël, C., Dissous, C., 2003. An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 51-62. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00249-9

Vicogne, J., Cailliau, K., Tulasne, D., Browaeys, E., Yan, Y., Fafeur, V., Vilain, J.P., Legrand, D., Trolet, J., Dissous, C., 2004. Conservation of epidermal growth factor receptor function in the human parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 279, 37407-37414. doi: 10.1074/jbc.M313738200

Yang, L., Dan, H.C., Sun, M., Liu, Q., Sun, X.M., Feldman, R.I., Hamilton, A.D., Polokoff, M., Nicosia, S.V., Herlyn, M., Sebt, S.M., Cheng, J.Q., 2004. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res.* 64, 4394-4399. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0343

Zeng, Z., Samudio, I.J., Zhang, W., Estrov, Z., Pelicano, H., Harris, D., Frolova, O., Hail, N. Jr, Chen, W., Kornblau, S.M., Huang, P., Lu, Y., Mills, G.B., Andreeff, M., Konopleva, M., 2006. Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 66, 3737-3746. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1278

Supplementary Figure 1.

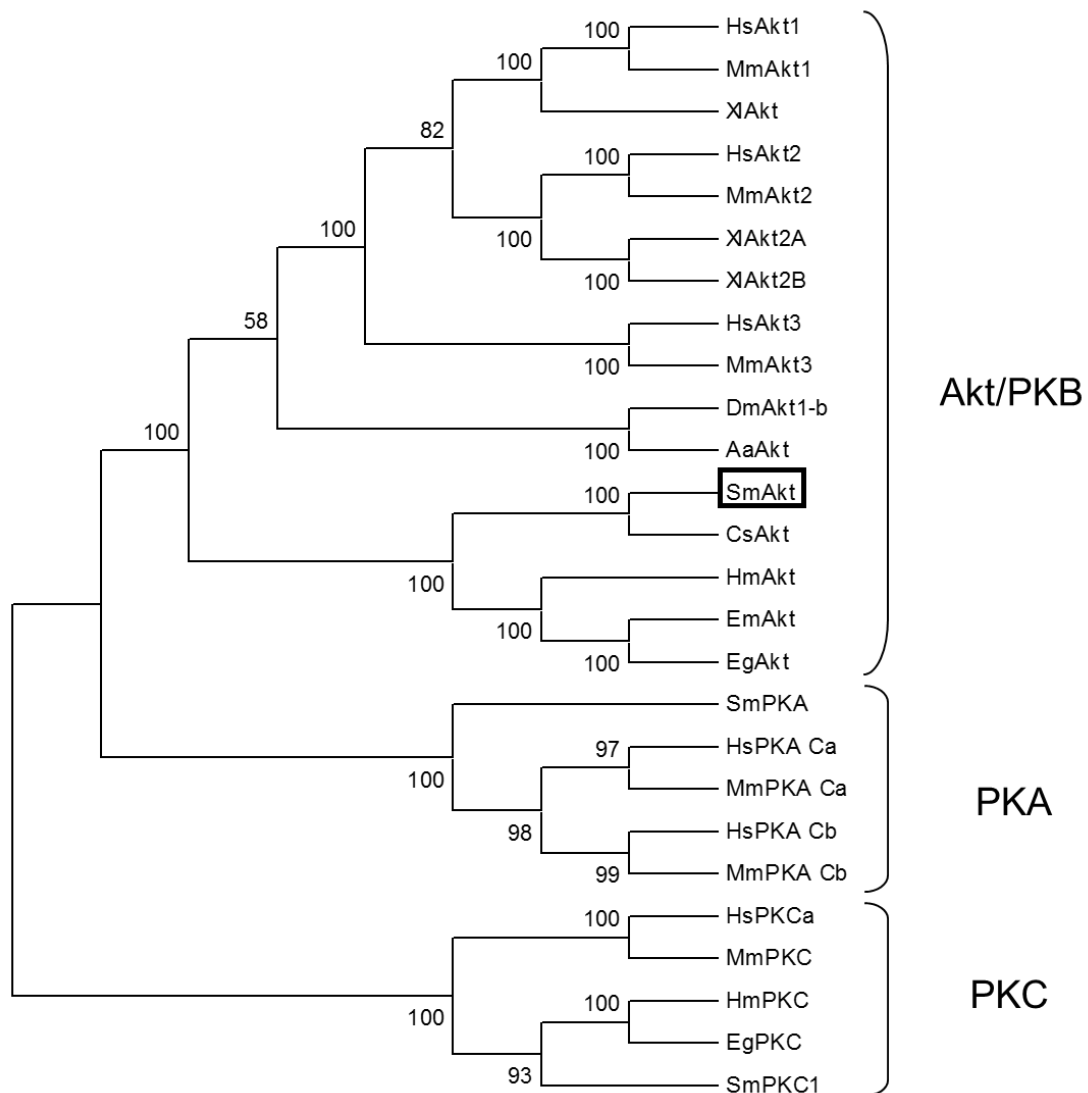


Fig. S1. Phylogenetic analysis of SmAkt.

The tree was generated with MEGA5 using the Neighbor-Joining method under the JTT matrix-based method with 1000 bootstrap repetitions. Phylogeny of SmAkt was analysed using Akt/PKB, PKA and PKC protein kinases of the following species: *Aedes aegypti* (AaAkt: AAP37655.1), *Clonorchis sinensis* (CsAkt: GAA49945.1), *Drosophila melanogaster* (DmAkt1-b: Q8INB9.3), *Echinococcus granulosus* (EgAkt: CDJ17771.1, EgPKC: CDJ19239.1), *E. multilocularis* (EmAkt: CCW28045.1), *Homo sapiens* (HsAkt1: AAL55732.1, HsAkt2: AAI20996.1, HsAkt3: AAH20479.1, HsPKA Ca: P17612.2, HsPKA Cb: P22694.2, HsPKCa: P17252.4), *Hymenolepis microstoma* (HmAkt: CDJ07747.1, HmPKC: CDJ12337.1), *Mus musculus* (MmAkt1: NP_033782.1, MmAkt2: AAH40377.1, MmAkt3: Q9WUA6.1, MmPKA Ca: P05132.3, MmPKA Cb: P68181.2, MmPKC: CAA36907.1), *Schistosoma mansoni* (SmPKA: ACT63838.1, SmPKC1: AAR00731.1) and *Xenopus laevis* (XIAkt: AAG59601.1, XIAkt2A: NP_001080091.1, XIAkt2B: NP_001085101.1).

Supplementary Figure 2.

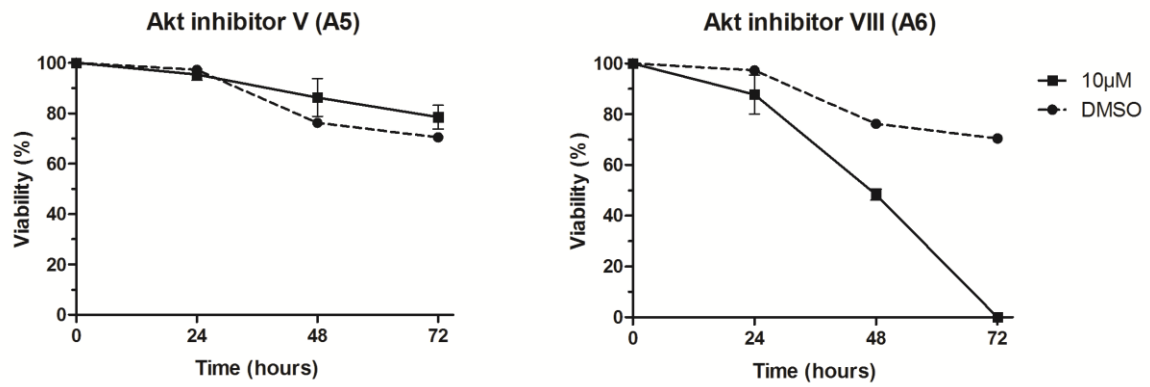


Fig. S2. Influence of A5 and A6 Akt inhibitors on schistosomula viability.

S. mansoni schistosomula were incubated with 10 μ M of A5 (Akt inhibitor V) or A6 (Akt inhibitor VIII). Results are expressed as % of surviving larvae at 24 h, 48 h and 72 h (mean \pm SEM of three independent experiments).

Supplementary Table 1.

#	PubChem ID	Product description	Main targets	% pairing (24 h)	% pairing (48 h)	% pairing (72 h)	% egg laying (72 h)
A2	2044	AG 1024	IGF-1R, IR	0	0	0	0
A3	9817165	AGL 2043	PDGFR, Kit	90 ± 5,77	66,67 ± 3,33	43,33 ± 6,67	59,16 ± 9,33
A4	5719375	Akt Inhibitor IV	Akt	0	0	0	1,29 ± 0,67
A5	290486	Akt Inhibitor V, Triciribine	Akt	90	80 ± 5,77	90	81,36 ± 32,27
A6	10196499	Akt Inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2	Akt	76,67 ± 8,82	50 ± 15,28	46,67 ± 8,82	40,95 ± 5,86
A7	16760284	Akt Inhibitor X	Akt	10 ± 5,77	0	3,33 ± 3,33	4,06 ± 1,34
A8	5113385	PDK1/Akt/Fit Dual Pathway Inhibitor	PKC	0	0	0	4,44 ± 3,4
A9	6610278	Aurora Kinase Inhibitor II	Aurora	83,33 ± 3,33	50 ± 5,77	36,67 ± 6,67	50,15 ± 23,72
A10	5311510	Bcr-abl Inhibitor	Bcr-abl	90 ± 5,77	43,33 ± 3,33	56,67 ± 3,33	27,42 ± 8,55
A11	2396	Bisindolylmaleimide I	GSK-3	93,33 ± 3,33	73,33 ± 6,67	56,67 ± 3,33	4,8 ± 2,1
B2	2399	Bisindolylmaleimide IV	PKC	76,66 ± 3,33	66,67 ± 8,82	30 ± 5,77	41,26 ± 0,96
B3	2427	BPIQ-I	EGFR	90 ± 5,77	60 ± 11,55	63,33 ± 3,33	78,98 ± 39,20
B4	72311	Chelerythrine Chloride	PKC	0	0	0	6,95 ± 4,9
B5	2857	Compound 56	EGFR	76,67 ± 6,67	33,33 ± 3,33	13,33 ± 13,33	1,48 ± 1,48
B6	9860529	DNA-PK Inhibitor II	DNA-PK	63,33 ± 12,02	23,33 ± 6,67	30 ± 5,77	25,11 ± 10,8
B7	9859309	DNA-PK Inhibitor III	DNA-PK, PI3K	86,67 ± 6,67	80 ± 10	83,33 ± 8,82	81,23 ± 46,67
B8	9884685	PI-103	DNA-PK, mTORC1, mTORC2	56,67 ± 20,28	16,67 ± 8,82	0	10,14 ± 5,22
B9	657356	Diacylglycerol Kinase Inhibitor II	Diacylglycerol Kinase	60 ± 20	20 ± 5,77	36,67 ± 6,67	56,04 ± 6,77
B10	5353593	DMBI	PDGFR, p90	93,33 ± 6,67	40 ± 11,55	90 ± 5,77	58,31 ± 19,58
B11	9843206	EGFR/ErbB-2 Inhibitor	EGFR, erbB2	83,33 ± 8,82	76,67 ± 3,33	46,67 ± 3,33	8,82 ± 2,50
C2	9549299	EGFR Inhibitor	EGFR	63,33 ± 8,82	40 ± 11,55	10 ± 5,77	0,59 ± 0,59
C3	11566580	EGFR/ErbB-2/ErbB-4 Inhibitor	EGFR, erbB1, erbB2, erbB4	83,33 ± 8,82	80 ± 10	73,33 ± 14,53	2,17 ± 1,37
C4	1048845	Fit-3 Inhibitor	Fit-3	93,33 ± 6,67	86,67 ± 6,67	83,33 ± 8,82	0,99 ± 0,19
C5	11601743	Fit-3 Inhibitor II	Fit-3	83,33 ± 3,33	66,67 ± 6,67	63,33 ± 12,02	22,06 ± 7,94
C6	11617559	cFMS Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor	FMS	100	100	86,67 ± 3,33	52,17 ± 3,93
C7	3501	G6 6976	PKC	70 ± 15,28	33,33 ± 18,56	33,33 ± 18,56	10,45 ± 5,75
C8	3499	G6 6983	PKC	93,33 ± 3,33	76,67 ± 14,53	70 ± 11,55	21,39 ± 4,49
C9	3385203	GTP-14564	FMS, Kit, Fit3, PDGFR	96,67 ± 3,33	80 ± 10	76,67 ± 13,33	80,46 ± 71,05
C10	16760502	Herbimycin A, Streptomycetes sp.	Src	36,67 ± 8,82	23,33 ± 6,67	6,67 ± 3,33	2,7 ± 2,7
C11	11772958	Fit-3 Inhibitor III	Fit-3, Kit, KDR, Abl, Cdk1, Src, Tie-2	53,33 ± 6,67	36,67 ± 3,33	6,67 ± 3,33	5,46 ± 0,75
D2	9549305	IGF-1R Inhibitor II	IGF-1R	86,67 ± 13,33	30 ± 5,77	0	4,08 ± 0,68
D3	11983295	IRAK-1/4 Inhibitor	IRAK-1, IRAK-4	93,33 ± 3,33	86,67 ± 8,82	63,33 ± 17,64	36,56 ± 37,04
D4	5494425	JAK Inhibitor I	JAK1, JAK2, Tyk2	100	100	100	28,99 ± 2,81
D5	3795	JAK3 Inhibitor II	JAK3	96,67 ± 3,33	83,33 ± 12,02	80 ± 10	74,32 ± 54,08
D6	176406	JAK3 Inhibitor IV	JAK1, JAK3, EGFR	96,67 ± 3,33	80 ± 10	90 ± 5,77	87,93 ± 20,07
D7	16760524	JAK3 Inhibitor VI	JAK3	20	10	6,67 ± 3,33	0,55 ± 0,55
D8	6603792	Lck Inhibitor	Lck, KDR, Tie-2	93,33 ± 3,33	50 ± 20	36,67 ± 12,02	18,12 ± 3,32
D9	3973	LY 294002	PI3K	90 ± 10	73,33 ± 21,86	80 ± 20	104,72 ± 72,58
D10	3971	LY 303511	Negative control of LY 294002	100	80 ± 15,28	70 ± 20,82	112,46 ± 38,65
D11	9549297	Met Kinase Inhibitor	Met	70 ± 20,82	0	0	21,81 ± 12,29
E1	4707	PD 158780	EGFR	30 ± 25,17	6,67 ± 6,67	10 ± 5,77	2,65 ± 2,65
E3	4709	PD 174265	EGFR	86,67 ± 8,82	76,67 ± 18,56	66,67 ± 23,33	29,44 ± 3,86
E4	5330548	PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor II	PDGFR	96,66 ± 3,33	93,33 ± 6,67	86,67 ± 13,33	31,28 ± 1,28
E5	10907042	PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor III	PDGFR, Kit, Fit-3	90 ± 10	83,33 ± 6,67	53,33 ± 8,82	10,63 ± 3,33
E6	9797370	PDGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor IV	PDGFR, Abl, Lck, Src, Fyn	70 ± 25,17	73,33 ± 26,67	56,67 ± 24,04	0
E7	16760609	PDGFR RTK Inhibitor	PDGFR, Kit	66,67 ± 3,33	23,33 ± 6,67	6,67 ± 6,67	12,56 ± 2,56
E8	6490494	PKR Inhibitor	PKR	16,67 ± 12,02	6,67 ± 6,67	6,67 ± 6,67	9,82 ± 1,82
E9	16760619	PKR Inhibitor, Negative Control	Negative control of PKR inhibitor	86,67 ± 8,82	76,67 ± 12,02	70 ± 20,82	101,26 ± 4,56
E10	5289247	PI 3-Kg Inhibitor	PI3K	93,33 ± 6,67	86,67 ± 13,33	86,67 ± 13,33	98,58 ± 2,58
E11	5287855	PI 3-Kb Inhibitor II	PI3K	83,33 ± 16,67	83,33 ± 16,67	83,33 ± 16,67	91,17 ± 20,47
F1	4879	PP3	EGFR	90 ± 5,77	83,33 ± 6,67	83,33 ± 6,67	80,65 ± 3,35
F3	5154691	PP1 Analog II, 1NM-PP1	Fyn, Src	73,33 ± 21,86	40 ± 15,28	6,67 ± 3,33	6,7 ± 3,3
F4	6711154	PKCβ/VEGFR Inhibitor	EGFR, PKC	0	3,33 ± 3,33	6,67 ± 6,67	49,5 ± 9,2
F5	6419755	PKCβ Inhibitor	PKC	23,33 ± 3,33	3,33 ± 3,33	3,33 ± 3,33	5 ± 5
F6	16760631	Rapamycin	p70S6K	60 ± 15,28	20 ± 10	20 ± 20	32,8
F7	644354	Rho Kinase Inhibitor III, Rockout	Rho kinase	90 ± 10	80 ± 15,28	60 ± 17,32	82,75 ± 5,45
F8	16760635	Rho Kinase Inhibitor IV	ROCKII, PKG, Aurora A, CaMKII	90 ± 5,77	86,67 ± 8,82	83,33 ± 12,02	103,8 ± 0,2
F9	16760627	Stausporine, N-benzoyl-	PKC, PDGFR, VEGFR, Syk	0	0	0	5,9 ± 5,9
F10	1474853	Src Kinase Inhibitor I	Src, Lck, VEGFR, FMS	63,33 ± 17,64	53,33 ± 6,67	53,33 ± 8,82	10,15 ± 3,45
F11	5329103	SU11652	PDGFR, VEGFR, FGFR, Kit	23,33 ± 12,02	0	0	0,45 ± 0,45
G2	6419747	Syk Inhibitor	Syk	90	73,33 ± 8,82	70 ± 10	11,77 ± 3,33
G3	16760670	Syk Inhibitor II	Syk, PKC	83,33 ± 6,67	63,33 ± 16,67	56,67 ± 17,64	40,83 ± 10,25
G4	672296	Syk Inhibitor III	Syk, Src	6,67 ± 6,67	0	0	0,43 ± 0,26
G5	447966	TGF-β RI Kinase Inhibitor	TGF-βR, p38 MAPK	100	90 ± 10	86,67 ± 8,82	75,67 ± 32,86
G6	16079009	TGF-β RI Inhibitor III	TGF-βR, p38 MAPK	0	0	0	37,9 ± 8,75
G7	2063	AG 9	EGFR	100	93,33 ± 6,67	90 ± 10	137,7 ± 72,5
G8	5328779	AG 490	EGFR	100	96,67 ± 3,33	96,67 ± 3,33	97 ± 23,83
G9	5328804	AG 112	EGFR	100	100	96,67 ± 3,33	42,93 ± 18,15
G10	2048	AG 1295	PDGFR	93,33 ± 3,33	96,67 ± 3,33	86,67 ± 8,82	56,6 ± 12,16
G11	2049	AG 1296	PDGFR	96,67 ± 3,33	93,33 ± 3,33	90	45,4 ± 38,3
H2	2051	AG 1478	EGFR	96,67 ± 3,33	96,67 ± 3,33	96,67 ± 3,33	16,37 ± 3,46
H3	6419834	VEGF Receptor 2 Kinase Inhibitor I	VEGFR	93,33 ± 3,33	43,33 ± 3,33	30 ± 10	25,77 ± 3,44
H4	9797919	VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor II	VEGFR	93,33 ± 3,33	30 ± 10	16,67 ± 8,82	18,6 ± 6,05
H5	99453618	VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitor IV	VEGFR, Kit, Src, EGFR	90 ± 5,77	40	33,33 ± 6,67	15,37 ± 7,62
H6	5329155	VEGF Receptor 2 Kinase Inhibitor II	VEGFR, EphB2, PDGFR, Kit, Tie-2	90 ± 10	23,33 ± 18,56	6,67 ± 6,67	1,53 ± 0,33
H7	5329098	VEGF Receptor 2 Kinase Inhibitor III	VEGFR	100	96,67 ± 3,33	86,67 ± 8,82	70,8 ± 17,91
H8	5329468	VEGF Receptor 2 Kinase Inhibitor IV	VEGFR	93,33 ± 3,33	96,67 ± 3,33	93,33 ± 3,33	71,47 ± 18,54
H9	16760391	DNA-PK Inhibitor V	DNA-PK, PI3K	90 ± 5,77	86,67 ± 8,82	80 ± 5,77	49,5 ± 17,91
H10	9549303	Aurora Kinase Inhibitor III	Aurora A, Lck, Bmx, IGF-1R, Syk	93,33 ± 3,33	73,33 ± 16,67	63,33 ± 12,02	5,4 ± 1,63
H11	451705	Stausporine, Streptomycetes sp.	PKC, MLCK, PKA, PKG, CaMK	40 ± 5,77	26,67 ± 3,33	26,67 ± 3,33	0,17 ± 0,17

Table S1. Results of the protein kinase inhibitor library screening on adult worms of *Schistosoma mansoni*.

Freshly perfused worms (10 couples) were incubated for 72 h with 10 μM of each inhibitor from the InhibitorSelect™ 96-Well Protein Kinase Inhibitor Library I (Calbiochem). The percentage of paired worms at 24 h, 48 h and 72 h (mean ± SEM of three independent experiments) and the total number of eggs laid during 72 h were determined. Results of egg laying are expressed in % of the number of eggs laid in DMSO control worms during 72 h (mean ± SEM of three independent experiments).

Supplementary Table 2.

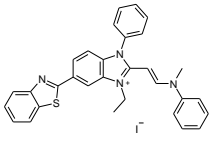
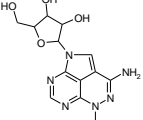
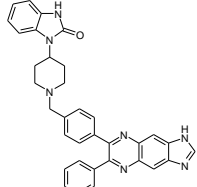
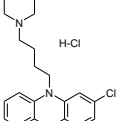
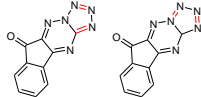
#	Structure	Name	Molecular formula	ATP competitive	References
A4		Akt inhibitor IV	C ₃₁ H ₂₇ N ₄ S	Yes	Kau <i>et al.</i> , 2003
A5		Akt inhibitor V Triciribin	C ₁₃ H ₁₆ N ₆ O ₄	No	Yang <i>et al.</i> , 2004
A6		Akt inhibitor VIII	C ₃₄ H ₂₉ N ₇ O	No	Barnett <i>et al.</i> , 2005
A7		Akt inhibitor X	C ₂₀ H ₂₆ Cl ₂ N ₂ O	No	Thimmaiah <i>et al.</i> , 2005
A8		PDK1/Akt/Fit dual pathway inhibitor	C ₁₀ H ₄ N ₆ O	Unknown	Zeng <i>et al.</i> , 2006

Table S2. Characteristics of Akt inhibitors.

III. Rôle de la protéine SmShb dans la signalisation de SmVKR1

Le criblage d'une banque d'ADNc de parasites adultes par la technique du double hybride en levure a permis d'identifier une protéine à domaine SH2, homologue aux protéines Shb, comme partenaire potentiel de SmVKR1 (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}).

Shb (Src Homology 2 domain-containing adapter protein B) est une protéine ubiquitaire identifiée en 1994 par l'équipe du Pr Michael Welsh. Il s'agit d'une protéine adaptatrice composée de deux domaines de liaison aux tyrosines phosphorylées : un domaine SH2 C-terminal et un domaine PTB central. Ces domaines sont associés à des motifs riches en Proline situés en position N-terminale, permettant la liaison de domaines SH3 (Welsh et al., 1994). Par l'intermédiaire de ces domaines, Shb interagit avec de nombreuses protéines parmi lesquelles une grande quantité de RTKs. De plus, Shb peut être phosphorylée sur des résidus Tyrosines permettant le recrutement d'autres protéines partenaires [Figure 47]. Ainsi, Shb représente une véritable plateforme permettant la transduction d'une multitude de signaux.

Proline rich motifs	PTB domain	Tyrosine phosphorylation sites	SH2 domain
c-Src	FAK	CrkII	PDGFRA
p85 PI3K	LAT	SLP76	PDGFRB
PLC-γ	Vav1	RasGAP	FGFR1
EPS8	LMP2A	c-Abl	TCR
GRB2			VEGFR2
JAK1/3			IL-2R
			c-Met
			EphB2
			GHR
			LMP2A

Figure 47 : Liste des partenaires des protéines Shb selon le domaine considéré (Welsh et al., 2016).

Le domaine PTB de Shb reconnaît préférentiellement la séquence D-D-X-pY tandis que le domaine SH2 se lie majoritairement au motif pY-T/V/I-X-L (Annerén et al., 2003; Karlsson et al., 1995).

Les nombreuses études effectuées par l'équipe du Pr Welsh ont montré que les effets de Shb sont pléiotropes et dépendants du type cellulaire ainsi que du mode d'activation de la cellule (facteur de croissance, niveau d'activation, stress,...). Ainsi, en fonction de son contexte cellulaire, Shb peut réguler l'activité de ERK, PI3K, Rap1, FAK, PLC-γ ou encore Rac1 et ainsi agir sur la différenciation, la prolifération, la survie ou la motilité cellulaire [Figure 48] (Annerén et al., 2003; Welsh et al., 2016).

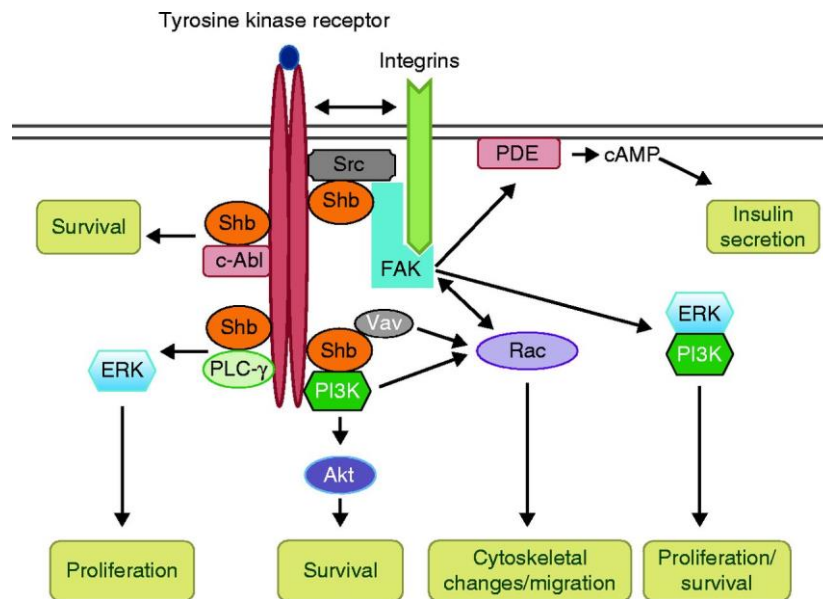


Figure 48 : Schéma illustrant les différents rôles possibles de Shb en fonction de ses partenaires (Welsh et al., 2016).

Par exemple, dans les cellules endothéliales, Shb se lie à la pY766 de FGFR-1, permet la phosphorylation de FRS2 et l'activation de la voie Ras-MEK-ERK1/2 régulant ainsi la prolifération cellulaire (Cross et al., 2002). Dans ce même type cellulaire, Shb interagit avec la pY1175 de VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) et régule la migration cellulaire par l'intermédiaire de PI3K (Holmqvist et al., 2004). Shb interagit également avec le récepteur au PDGF- α (Platelet-Derived Growth Factor α) *via* la pY720 et est impliqué dans la réorganisation du cytosquelette dépendante de l'activation du récepteur par le PDGF (Hooshmand-Rad et al., 2000). Shb joue aussi un rôle dans la différenciation des cellules neuronales PC12 en réponse au NGF (Nerve Growth Factor) et au bFGF (basic FGF) (Karlsson et al., 1998). Dans les lymphocytes T, Shb s'associe au complexe TCR (T Cell Receptor) régulant ainsi positivement la transcription de l'IL-2 (Lindholm et al., 1999). Shb interagit avec c-Abl d'une façon complexe impliquant les domaines SH2 et SH3 d'Abl. En réponse à un stress, cette liaison permet de réguler l'activité d'Abl et de moduler positivement sa signalisation pro-apoptotique (Hägerkvist et al., 2007). Shb joue également un rôle dans la différenciation des cellules souches embryonnaires de souris (Welsh et al., 2016).

Pour vérifier le rôle de Shb *in vivo*, une lignée de souris transgéniques knock-out (KO) pour le gène *Shb* a été générée par l'équipe du Pr Welsh en 2007 (Kriz et al., 2007). Les souris ainsi déficientes pour *Shb* présentent différents phénotypes parmi lesquels : 1) des défauts dans la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire (Calounova et al., 2010) ; 2) une diminution de la sécrétion d'insuline (Akerblom et al., 2009) ; 3) un défaut de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques ; 4) une réponse immunitaire Th2 exacerbée (Gustafsson et al., 2011, 2013).

Il existe chez les mammifères trois paralogues de Shb : Shd, She et Shf. Ceux-ci possèdent un domaine SH2 similaire à celui de Shb mais sont plus divergents dans leur partie N-terminale. Shd et She ont été identifiées comme partenaires de la kinase Abl (Oda et al., 1997) tandis qu'il a été montré que Shf s'associe au récepteur au PDGF- α et régule l'apoptose (Lindholm et al., 2000).

A. SmShb régule la signalisation de SmVKR1

La suite de mon travail de thèse a concerné l'étude de la protéine SmShb, identifiée préalablement comme partenaire potentiel de SmVKR1 (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}). Les résultats obtenus font l'objet d'un article de recherche récemment soumis à PLoS Pathogens sous le titre « SmShb, the SH2-containing adaptor protein B of *Schistosoma mansoni* mediates a JNK pathway dependent on Venus Kinase Receptor ».

Tout d'abord, j'ai effectué une analyse *in silico* de la séquence de SmShb afin de confirmer son appartenance à la famille des protéines Shb. La séquence codante a été ensuite clonée en vecteur d'expression.

Dans un premier temps, des expériences d'interaction directe en levure ont démontré que SmShb interagit spécifiquement avec SmVKR1 phosphorylé. En revanche, aucune interaction n'est détectée entre SmShb et d'autres RTKs du parasite tels que SmVKR2, SmIR1 ou SmIR2.

Par la suite, ces résultats ont été confirmés et complétés dans le modèle d'ovocyte de xénope, en collaboration avec le Dr Katia Cailliau. En effet, la co-expression de SmShb et SmVKR1 nous a permis de vérifier leur interaction en démontrant la co-immunoprécipitation des deux protéines par analyse en western blot. De plus, l'analyse du complexe à l'aide d'anticorps anti-phosphotyrosine (PY20) a mis en évidence la phosphorylation de SmShb lorsqu'il interagit avec SmVKR1. En parallèle, l'expression de formes tronquées de la protéine SmShb (SmShb Δ SH2, dépourvu du domaine SH2, et SH2_{SmShb}, correspondant au domaine SH2 isolé) a permis de démontrer la nécessité du domaine SH2 de SmShb dans l'interaction entre les deux protéines.

Le domaine SH2 des protéines Shb se lie préférentiellement au motif pY-T/V/I-X-L (Karlsson et al., 1998). Dans la séquence de SmVKR1, une seule Tyrosine en position juxtamembranaire se rapproche de ce consensus : pY₉₇₉ENL. La mutation de cette Tyrosine par un résidu Phénylalanine non phosphorylable (SmVKR1 Y₉₇₉F) nous a permis de démontrer son implication dans l'interaction SmVKR1-SmShb. L'alignement des domaines juxtamembranaires de SmVKR1 et de SmVKR2 indique que le motif Y₉₇₉ENL de SmVKR1 correspond à la séquence F₉₄₉EEL chez SmVKR2. De manière intéressante, la mutation de la Phénylalanine en Tyrosine (SmVKR2 F₉₄₉Y) permet l'interaction entre SmVKR2 et SmShb. Ces résultats mettent en évidence la nécessité de cette Tyrosine juxtamembranaire pour la formation du complexe SmVKR1-SmShb.

Lors de l'analyse des voies de signalisation des SmVKRs, nous avons montré que SmVKR1 et SmVKR2 sont tous deux capables d'activer les voies Akt et ERK. En revanche, seule l'activation de SmVKR1 entraîne la phosphorylation de JNK (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}). Dans ce travail, nous avons pu montrer que SmShb oriente spécifiquement la signalisation de SmVKR1 vers une voie JNK, au détriment des voies ERK et Akt. L'implication de SmShb dans cette voie JNK a été confirmée de deux façons : 1) Le domaine SH2 seul de SmShb inhibe la voie JNK dépendante de SmVKR1 ; 2) Le complexe SmVKR2 F₉₄₉Y-SmShb induit la voie JNK alors que le mutant SmVKR2 F₉₄₉Y seul n'induit comme SmVKR2 WT que les voies Akt et ERK.

Des expériences d'hybridation *in situ*, effectuées par le Dr Steffen Hahnel dans le cadre de notre collaboration avec le Pr Christoph Grevelding, indiquent une expression préférentielle de SmShb au niveau des ovocytes matures chez la femelle et au niveau des testicules chez le mâle mettant ainsi en évidence une co-localisation des transcrits *SmShb* et *Smvkr1* au niveau des organes reproducteurs du parasite. De plus, un plus faible marquage est également détecté dans les autres tissus, suggérant une expression ubiquitaire de SmShb.

Afin d'analyser le rôle de SmShb dans les fonctions biologiques de *S. mansoni*, j'ai entrepris des expériences d'ARN interférence. Le traitement de couples de parasites adultes avec des ARN double brin (dsRNA) ont permis une diminution de 80% des transcrits de *SmShb* après 7 jours de culture. L'observation des parasites en microscopie confocale a mis en évidence une accumulation de spermatozoïdes au niveau des testicules des parasites mâles.

Dans le but de mieux définir le rôle du signal dépendant du complexe SmVKR1-SmShb, une recherche des partenaires de SmShb a été entreprise en criblant une banque d'ADNc de vers adultes par la technique du triple hybride en levure. Pour cela, j'ai cloné SmShb et le domaine intracellulaire actif de SmVKR1 à l'intérieur d'un même vecteur (pBridge). Cette stratégie permet la phosphorylation de SmShb et donc la recherche de partenaires de SmShb potentiellement dépendants de sa phosphorylation. Cela m'a conduit à identifier 73 partenaires potentiels de SmShb. Parmi les protéines identifiées, certaines avaient déjà été piégées lors de la recherche de partenaires de SmVKR1 (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}). D'autres ont été identifiées dans ce criblage, parmi lesquelles SmTcTex-1 et SmRhoU, deux protéines partenaires de SmShb qui ont fait l'objet d'études supplémentaires qui seront détaillées à la suite de l'article.

Ensemble, les résultats décrits dans cet article suggèrent que SmShb pourrait constituer une plateforme permettant d'orienter la signalisation de SmVKR1 spécifiquement vers une voie JNK. Cette voie JNK pourrait être impliquée dans la réorganisation du cytosquelette et la migration cellulaire.

SmShb, the SH2-Containing Adaptor Protein B of *Schistosoma mansoni* Mediates a JNK Pathway Dependent on Venus Kinase Receptor

Marion Morel¹, Mathieu Vanderstraete¹, Katia Cailliau², Steffen Hahnel³, Christoph G. Grevelding³ and Colette Dissous^{1*}

1. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR 8204 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France

2. Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France

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

* Corresponding author

E-mail: colette.dissous@pasteur-lille.fr (CD)

Abstract

Venus kinase receptors (VKRs) are invertebrate receptor tyrosine kinases (RTKs) formed by an extracellular Venus Fly Trap (VFT) ligand binding domain associated *via* a transmembrane domain with an intracellular tyrosine kinase (TK) domain. *Schistosoma mansoni* VKRs, SmVKR1 and SmVKR2, are both implied in reproductive activities of the parasite. In this work, we show that the SH2 domain-containing protein SmShb is a specific partner of the phosphorylated form of SmVKR1. Expression of these proteins in *Xenopus* oocytes allowed us to demonstrate that the SH2 domain of SmShb interacts specifically with the phosphotyrosine residue (pY979) located in the juxtamembrane region of SmVKR1. This interaction leads to phosphorylation of SmShb on tyrosines and promotes SmVKR1 signaling towards a unique JNK pathway. *SmShb* transcripts are expressed in all parasite stages and located in ovary and testes of adult worms, suggesting a possible colocalization of SmShb and SmVKR1 proteins. A yeast-three hybrid screening allowed us to identify various potential interaction partners of the SmVKR1/SmShb complex, including a RhoU GTPase homolog with potential function in JNK signaling and in cytoskeletal dynamics, a TcTex-1 protein with potential role in sperm motility. These findings suggest that SmShb acts as a specific adaptor to modulate SmVKR1 activity by the formation of multi-protein complexes containing proteins involved in cytoskeletal modelling. Silencing of *SmShb* in adult *S. mansoni* resulted in an accumulation of mature sperm in testes, indicating a possible role of SmShb in sperm motility as well as in cytoskeletal functions dependent on SmVKR1 signaling.

Author Summary

Schistosomiasis is a chronic, debilitating disease affecting more than 240 million people in the world caused by parasitic flatworms of the genus *Schistosoma*. Pathology is mainly due to massive egg production by parasites. Molecular processes responsible for gonad development or egg production in schistosomes are largely studied since they represent good targets against pathogenesis and dissemination of schistosomiasis. We have shown previously that atypical invertebrate receptor tyrosine kinases, the Venus Kinase Receptors (VKRs), are involved in reproductive organ development and gametogenesis in *S. mansoni*. Studies of SmVKR signaling partners highlighted a Src Homology -2 (SH2) domain-containing protein B (Shb) as a specific partner of SmVKR1. In mammals, Shb proteins were known to regulate RTK signaling but their role in invertebrates and their possible function in invertebrate specific receptor signaling has not been described yet. In this work, we characterized the SmShb protein and demonstrated its interaction with one of the schistosome VKR, SmVKR1. We also demonstrated for the first time the ability of Shb proteins to induce JNK activation, a pathway which could be involved in cytoskeletal modeling and possibly in gamete mobility and in reproduction.

Introduction

Schistosomiasis represents the second most important parasitic disease in the world. Platyhelminths of the *Schistosoma* genus affect more than 240 million people in tropical and subtropical areas and are responsible for about 200 000 deaths per year [1]. The pathology of schistosomiasis mainly results from the accumulation of eggs in host tissues. Each female worm can lay hundreds of eggs per day, and most of them are released in feces or urine thus sustaining the life cycle. However, many eggs are trapped into host tissues and their encystment induces the formation of granulomas and leads to severe disorders, particularly hepatosplenomegaly, hepatic fibrosis and bladder cancer [2]. Praziquantel (PZQ) is the drug used currently to cure schistosomiasis. It is safe, affordable and effective against the three major species of schistosomes infecting humans (*S. mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum*) but its massive administration in endemic areas has already led to the emergence of PZQ-tolerant parasites [3–6]. In this context, there is a necessity to find new drugs against schistosomes and compounds able to inhibit parasite reproduction would appear as excellent candidates for the control of schistosomiasis transmission and pathology.

Protein kinases, and particularly tyrosine kinases (TKs), play important roles in development and metabolism. Receptor tyrosine kinase (RTK) signaling networks are essential for many cellular activities such as growth, proliferation, differentiation or migration and they represent major targets in anti-cancer therapy [7]. Different studies have demonstrated the importance of *S. mansoni* TKs in gametogenesis and egg production and they have indicated that parasite kinases should be considered as interesting targets for the development of new therapeutics against schistosomes [8–10].

Particularly, our recent studies have demonstrated the importance of Venus Kinase Receptors (VKRs) in the control of reproduction in *S. mansoni* [11]. VKRs are atypical RTKs formed by an extracellular Venus Fly Trap (VFT) domain associated *via* a single transmembrane domain with an intracellular TK domain similar to that of insulin receptors (IR) [12,13]. Since their discovery in *S. mansoni* in 2003 [12], VKRs have been identified in diverse invertebrate phyla including platyhelminths, arthropods, annelids, mollusks, echinoderms and cnidarians [13,14] and their function in reproduction has been confirmed recently in the mosquito *Aedes aegypti* [15]. Most of the organisms express a single VKR but in several species, multiple *vkr* genes are present and encode different VKR homologs [14]. Two VKR molecules, SmVKR1 and SmVKR2, are expressed in *S. mansoni* larval and adult parasites and they were shown to participate in the development of ovary in female worms. SmVKR1 and SmVKR2 are two different receptors that are activated by distinct ligands [16] and they can differentially induce kinase signaling pathways. When they are expressed in *Xenopus* oocytes, each receptor activates both ERK2 and Akt pathways but only SmVKR1 can induce JNK phosphorylation [11,17].

Differential analyses between SmVKR1 and SmVKR2 interacting proteins have highlighted a Src Homology -2 (SH2) domain-containing protein B (Shb) as a potential downstream signaling partner of SmVKR1. Shb proteins are pleiotropic adaptor proteins that convey signals from membrane RTK to intracellular signaling intermediates. They possess a C-terminal SH2 domain and a central PhosphoTyrosine Binding (PTB) domain both involved in interaction with phosphorylated tyrosines, as well as an N-terminal Proline-rich sequence that binds SH3 domains [18]. Shb proteins enable protein-protein interactions and act as platforms linking activated RTKs to various downstream signaling partners [19,20].

In this paper, we show that the *S. mansoni* Shb protein (SmShb) interacts specifically with the membrane receptor SmVKR1. This interaction is dependent on the phosphorylation of the juxtamembrane Y₉₇₉ residue of SmVKR1, occurs through the SH2 domain of SmShb and induces the specific activation of a JNK signaling pathway in *Xenopus* oocytes. *In situ* hybridization shows that both *SmShb* and *Smvkr1* transcripts co-localize in the reproductive organs of the parasite and *SmShb* silencing experiments exhibit morphological effects within the testes suggesting a role of SmShb in sperm migration. Moreover, yeast two-hybrid (Y2H) screening identified SmShb-interacting molecules potentially involved in cell migration. All together, these data describe for the first time a molecular function of Shb proteins in JNK signaling and suggest the potential importance of SmShb in development and/or reproduction of *S. mansoni*.

Results

Sequence analysis of SmShb

We used the active kinase and tyrosine-phosphorylated intracellular domain of SmVKR1 (SmVKR1 ICD YYRE) [21] as bait for Y2H library screening and isolated a partial sequence referred in Genbank databases as a hypothetical SH2 domain-containing protein (accession N° CCD77461). By RACE-PCR, we could clone and edit the full-length cDNA sequence which was shown to encode an adaptor protein of the Shb family that we named SmShb (Genbank accession N° JN864885). BLAST analysis showed that the *SmShb* gene is present on chromosome 2 and is composed of 9 exons for a total length of about 113 Kb (Fig S1A). *SmShb* codes for a protein of 1159 residues containing a Pro-rich domain from positions 288 to 407 (exon 5) and a C-terminal SH2-domain from residues 1054 to 1139 encoded by exons 8 and 9 (Fig 1A). This sequence is similar to the SH2 domain-containing protein B described for the first time by Welsh et al [18] with roles in signal transduction of ligand-activated RTKs [22]. The Shb family is composed of Shb proteins together with the three paralogs Shd, She and Shf proteins [23,24], and is distinct from the Shc, Grb2, Grb7 or Nck families, which are all composed of adaptor proteins with SH2 domains together with other variable motifs for protein-protein interaction. Phylogenetic analysis presented in Fig 1B has confirmed that SmShb belongs to the family of Shb proteins. SmShb is close to its ortholog CsShb of the trematode parasite *Clonorchis sinensis*. Furthermore, within the Shb family, platyhelminth (trematode and cestode) and insect proteins form two individual groups linked to the common branch of invertebrate Shb proteins which is distinct from that of mammalian Shb proteins.

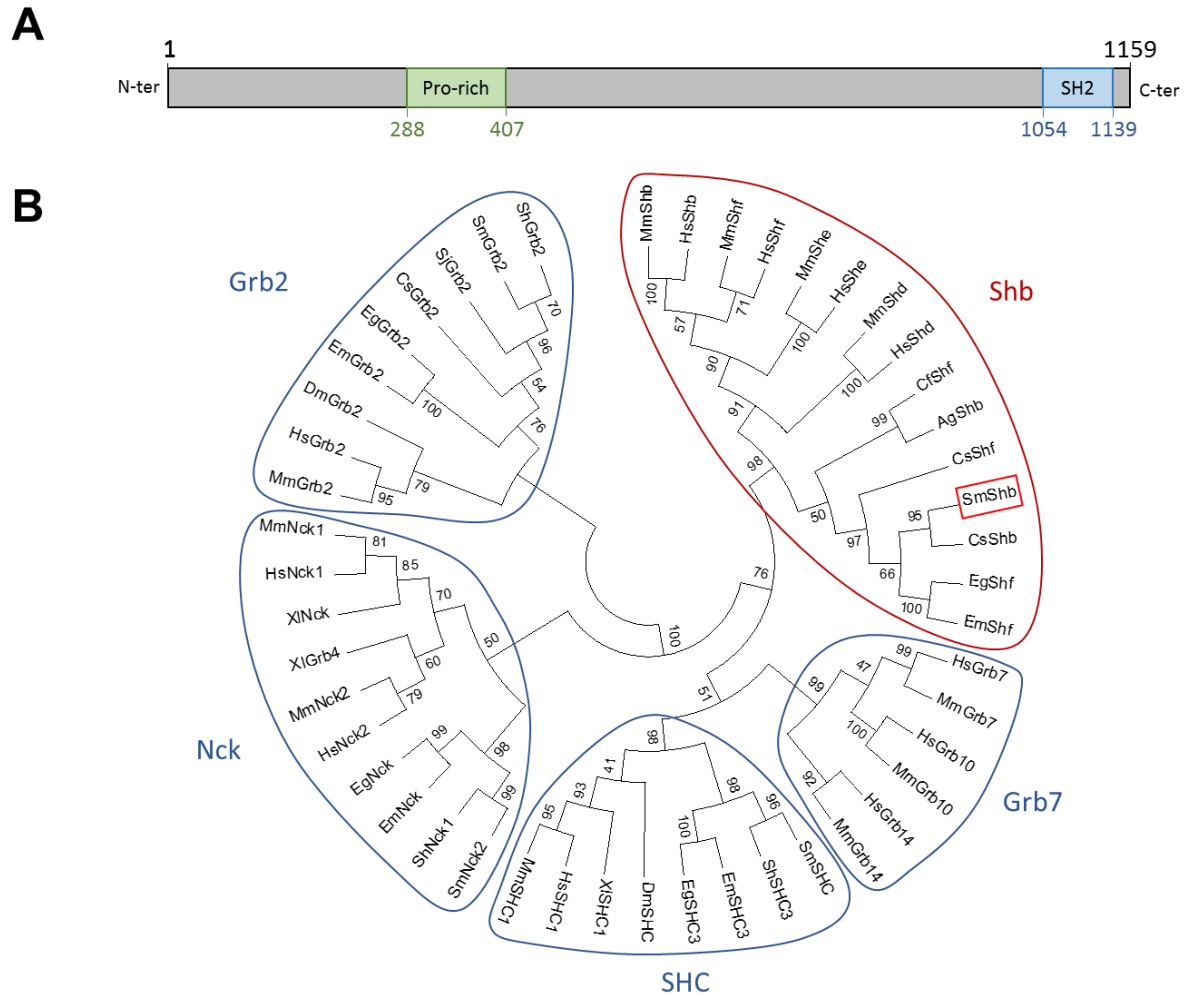


Figure 1: SmShb belongs to the Shb protein family

(A) SmShb is a protein of 1159 amino acids with a Proline-rich domain (AA288-407, in green) in its N-terminal part and an SH2 domain in its C-terminal end (AA1054-1139, in blue). **(B)** A phylogenetic tree was generated using the maximum likelihood method under the JTT+G+I model with a bootstrap test (1000 replicates). The tree was generated using the alignment of proteins from Shb (*Mus musculus* MmShb NP_001028478.1, MmShf NP_001013851.2, MmShe AAI09363.2, MmShd BAA33805.1; *Homo sapiens* HsShb CAA53091.1, HsShf Q7M4L6.2, HsShe Q5VZ18.1, HsShd Q96IW2.1; *Camponotus floridanus* CfShf EFN71155.1; *Anopheles gambiae* AgShb XP_309808.4; *Clonorchis sinensis* CsShf GAA56149.1, CsShb GAA50136.1; *Schistosoma mansoni* SmShb AFH41560.1; *Echinococcus granulosus* EgShf CDS15334.1 and *E. multilocularis* SmShf CDJ02881.1), Grb2 (*S. haematobium* ShGrb2 KGB37632.1; SmGrb2 CCD60977.1; *S. japonicum* SjGrb2 CAX75443.1; CsGrb2 GAA48411.1; EgGrb2 CDS18126.1; EmGrb2 CDJ01173.1; *Drosophila melanogaster* DmGrb2 NP_476858.1; HsGrb2 CAG46740.1 and MmGrb2 AAB40022.1), Grb7 (HsGrb7 BAA29059.1, HsGrb10 NP_005302.3, HsGrb14 AAC15861.1; MmGrb7 NP_034476.1, MmGrb10 AAB53687.1, MmGrb14 AAF43996.1), SHC (SmSHC CCD76305.1; ShSHC3 KGB39408.1; EmSHC3 CDJ05613.1; EgSHC3 EUB61901.1; DmSHC NP_524683.2; *Xenopus laevis* XISHC1 NP_001083932.1; HsSHC1 NP_892113.4; MmSHC1 NP_001106802.1), and Nck (SmNck2 CCD77399.1; ShNck1 KGB32228.1; EmNck CDJ02918.1; EgNck CDS15372.1; HsNck2 NP_001004720.1, HsNck1 NP_001278928.1; MmNck2 NP_035009.3, MmNck1 NP_035008.2; XlGrb4 NP_001083313.1, XINck AAH80058.1) families.

SmShb interacts specifically with active SmVKR1

As only a part of the protein SmShb was demonstrated to interact with SmVKR1 ICD during the initial cDNA library screening, we further used the full-length sequence of SmShb to confirm interaction between the two proteins in a direct binding assay in yeast. Similar assays were also performed using the kinase active ICDs of SmVKR2 and of the two insulin receptors SmIR1 and SmIR2 of *S. mansoni* in order to study the specificity of the SmShb adaptor protein for the parasite RTKs. Fig 2A shows that only diploid yeasts which expressed SmShb and SmVKR1 ICD YYRE can grow on the selective medium SD -Leu/-Trp/-His/-Ade. Moreover, the absence of growth for diploids expressing SmShb and the dead kinase (DK) version of SmVKR1 ICD strongly suggested that the interaction between SmShb and SmVKR1 was not only specific for this RTK but also dependent on its phosphorylation (Fig 2A). These results were confirmed by co-expressing these proteins in *Xenopus* oocytes (Fig 2B). When SmShb was co-expressed either with SmVKR1 ICD wild-type or with SmVKR1 ICD YYRE (already shown to be tyrosine-phosphorylated in this system [21]), co-immunoprecipitation tests revealed the formation of complexes between SmShb and SmVKR1 ICD YYRE but not with SmVKR1 ICD wild-type. Similarly, no interaction was observed between the phosphorylated intracellular domain of SmVKR2 (SmVKR2 ICD YYRE) and SmShb (Fig 3), confirming the specificity of the binding between SmShb and SmVKR1 in its phosphorylated form.

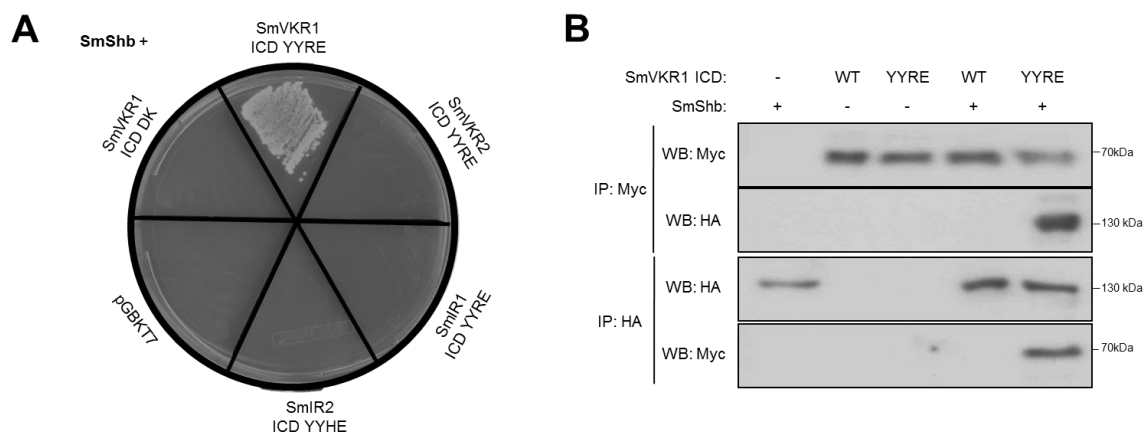


Figure 2: SmShb interacts specifically with activated SmVKR1

(A) Direct interaction in *S. cerevisiae* yeasts: AH109 yeasts expressing Gal4AD-fused SmShb were mated with Y187 yeasts expressing only Gal4DBD (pGBT7), Gal4DBD-fused ICD YYxE (active kinase) of SmVKR1, SmVKR2, SmIR1 or SmIR2, or Gal4DBD-fused ICD DK (dead kinase) of SmVKR1. Diploids were allowed to grow on a minimal SD -Leu/-Trp medium and diploids expressing interacting proteins were then selected on SD -Leu/-Trp/-His/-Ade medium. Only yeasts expressing SmShb and SmVKR1 ICD YYRE were growing on the selective medium.

(B) cRNAs encoding Myc-tagged SmVKR1 ICD WT or YYRE were co-injected in *Xenopus* oocytes with cRNA encoding HA-tagged SmShb. Oocytes were incubated for 5h in ND96 medium and lysed. Proteins from soluble extracts were immunoprecipitated (IP) by anti-Myc or anti-HA antibodies and immune complexes were analyzed by Western Blot (WB) to detect SmShb (130 kDa) and SmVKR1 ICD YYRE (68 kDa) with anti-HA and anti-Myc antibodies.

The SH2 domain of SmShb binds to SmVKR1

The primary function of an SH2 domain is to interact with phosphorylated tyrosines [25]. In order to assess the role of the SH2 domain of SmShb for its binding to activated SmVKR1, we produced two additional HA-tagged constructs of SmShb, one in which the SH2 domain was deleted (SmShb^{ΔSH2}) and another one which encoded only the SH2 domain (SH2_{SmShb}). Each construct (SmShb, SmShb^{ΔSH2}, SH2_{SmShb}) was co-expressed with SmVKR1 ICD YYRE in *Xenopus* oocytes and the ability to interact with SmVKR1 was analyzed by co-immunoprecipitation. The results indicated that SmVKR1 ICD YYRE co-precipitates with SmShb as well as with its SH2 domain but not with its SH2-deleted variant. This showed that the SH2 domain is necessary and sufficient to permit SmShb interaction with the phosphorylated ICD of SmVKR1. Moreover, SmShb-SmVKR1 ICD YYRE complexes contained a 130kDa protein recognized by anti-phosphotyrosine (PY20) antibodies, which likely represents SmShb. This indicated that SmShb is probably a substrate of SmVKR1. In addition, experiments with the second schistosome VKR, SmVKR2, showed no co-precipitation with any variant of SmShb, confirming the specificity of SmShb for SmVKR1 (Fig 3).

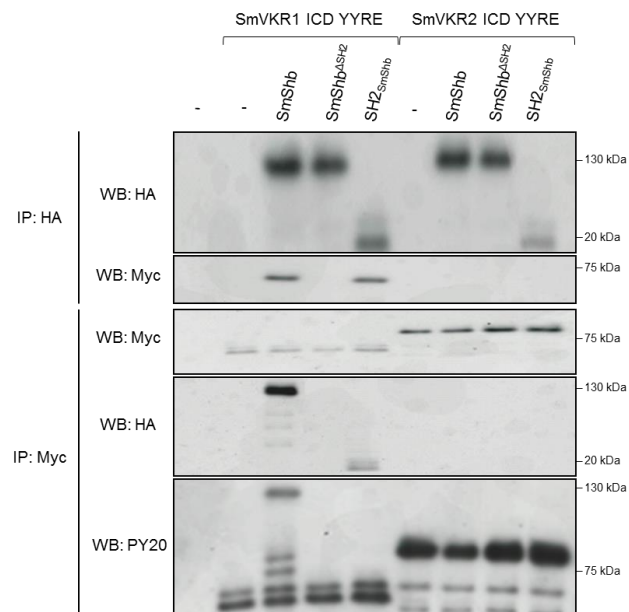


Figure 3: SmVKR1 co-precipitates with SmShb and SH2_{SmShb} but not with SmShb^{ΔSH2}

cRNAs encoding Myc- SmVKR1 ICD YYRE or SmVKR2 ICD YYRE were injected in *Xenopus* oocytes alone or with HA- SmShb, SmShb^{ΔSH2} or SH2_{SmShb}. Oocytes were incubated for 5h in ND96 medium and lysed. Proteins from soluble extracts were immunoprecipitated (IP) by anti-Myc or anti-HA antibodies and analyzed by Western Blot (WB) with anti-Myc, anti-HA or anti-Phosphotyrosine (PY20) antibodies. Myc-SmVKR1 ICD YYRE (68 kDa), Myc-SmVKR2 ICD YYRE (81 kDa), HA-SmShb (130 kDa), HA-SmShb^{ΔSH2} (118 kDa) and HA-SH2_{SmShb} (10 kDa) were detected. HA-SmShb and HA-SH2_{SmShb} but not HA-SmShb^{ΔSH2} were detected in immune complexes formed with Myc-SmVKR1 ICD YYRE. PY20 antibodies revealed the phosphorylation of SmVKR1 and SmVKR2 ICD YYRE as well as that of SmShb (130kDa) in the immune complexes formed with SmVKR1 ICD YYRE.

SmShb recognizes the juxtamembrane residue Y₉₇₉ of SmVKR1

SH2 domains of Shb proteins have been shown to bind phosphorylated tyrosines (pY) included in the consensus motif pYxxL [26]. Along the SmVKR1 ICD sequence, we identified only one motif (Y₉₇₉ENL) fitting to this consensus and it was found located within the juxtamembrane region of the receptor. In order to analyze the importance of this motif for the binding of SmShb to SmVKR1, we produced a mutant receptor (SmVKR1 Y₉₇₉F) in which Y₉₇₉ was replaced by a phenylalanine as a non-phosphorylatable residue. We then compared the capacity of active ICD of SmVKR1 or SmVKR1 Y₉₇₉F to co-precipitate with SmShb after co-expression in *Xenopus* oocytes. The results showed that SmShb was not able to interact with SmVKR1 Y₉₇₉F, indicating that the residue Y₉₇₉ is involved and required for the interaction of SmVKR1 ICD with the SH2 domain of SmShb (Fig 4A).

Since our aim was to further investigate the role of SmShb in the regulation of SmVKR1 activation pathways, it was necessary to confirm these previous observations in the context of a ligand-dependent activation of SmVKR1. According to this, full-length SmVKR1 WT and SmVKR1 Y₉₇₉F proteins were co-expressed with SmShb in *Xenopus* oocytes and membrane receptors were further activated by L-Arginine (L-Arg) binding as previously described [16]. Western blot analysis using PY20 antibodies showed the expression of active RTKs auto-phosphorylated after binding of L-Arg. Results of co-immunoprecipitation also confirmed that the Y₉₇₉ residue of SmVKR1 was required for interaction with and phosphorylation of SmShb (Fig 4B).

Interestingly, the amino acid sequence F₉₄₉EEL occurs in the juxtamembrane part of SmVKR2, which does not interact with SmShb (Fig 3). To investigate its biological meaning with respect to binding of partners, we considered to transform this motif in a YxxL consensus with Shb binding potential by a single F₉₄₉Y exchange. Protein expression in oocytes and co-immunoprecipitation experiments were performed using the same conditions as described for SmVKR1, except that SmVKR2 receptors were activated by their specific ligands, Ca⁺⁺ ions [16]. The results confirmed the interaction analysis in yeast mentioned above and that activated wild-type SmVKR2 does not interact with SmShb. However, activated SmVKR2 F₉₄₉Y containing the pYxxL motif is able to bind SmShb, very likely by its SH2 domain (Fig 4C). Western blot results confirmed that SmShb binds selectively to phosphorylated SmVKR2 F₉₄₉Y and that it is phosphorylated inside of the complex. These data indicate that a juxtamembrane pYExL motif in SmVKR is necessary and sufficient to allow interaction with SmShb.

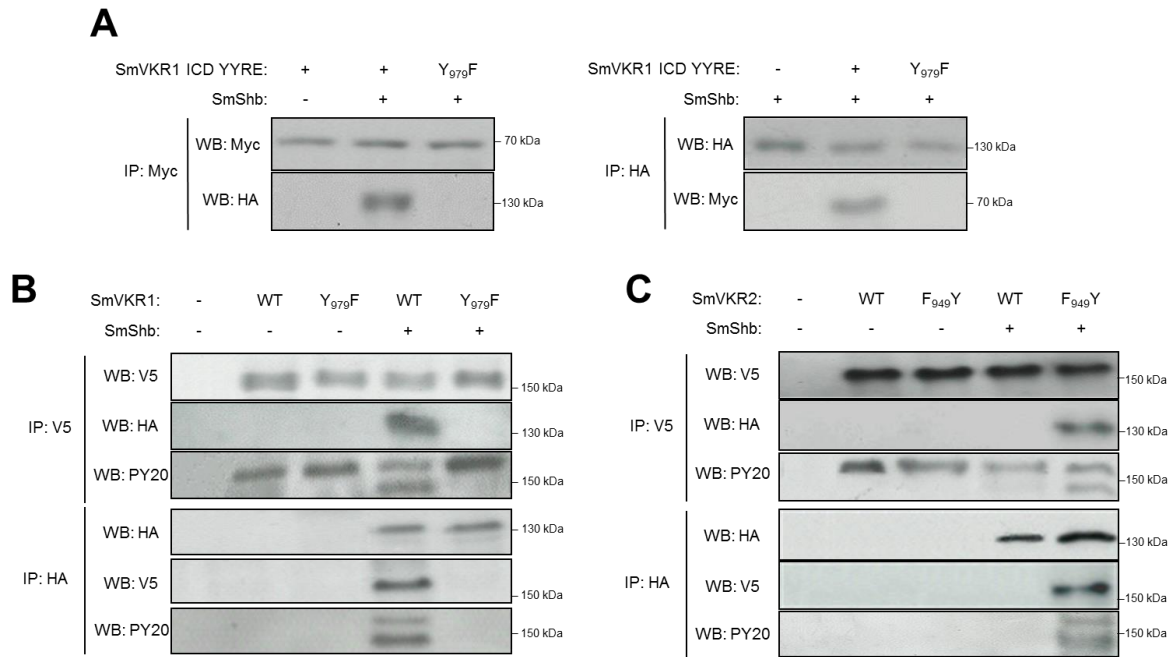


Figure 4: SmShb binds to the juxtamembrane tyrosine (Y979) of SmVKR1

(A) cRNAs encoding the intracellular domains (ICD) of Myc- SmVKR1 YYRE or SmVKR1 YYRE Y₉₇₉F were co-injected in *Xenopus* oocytes with HA-SmShb and soluble extracts were immunoprecipitated (IP) by anti-Myc or anti-HA antibodies. Immune complexes were analyzed by Western Blot (WB) using anti-Myc or anti-HA antibodies. SmShb co-precipitates with SmVKR1 ICD YYRE but not with SmVKR1 ICD YYRE Y₉₇₉F. **(B)** Similar experiments performed with V5-SmVKR1 WT or V5-SmVKR1 Y₉₇₉F full-length receptors demonstrate that only SmVKR1 WT activated by L-arginine and phosphorylated binds to and phosphorylates SmShb as revealed by PY20 antibodies. **(C)** At the opposite, the mutated V5-SmVKR2 F₉₄₉Y activated by Ca⁺⁺ and phosphorylated can bind and phosphorylate SmShb but not the wild type SmVKR2 receptor.

SmVKR - SmShb interaction activates JNK

Previous studies have shown that the activation of both SmVKR1 and SmVKR2 triggers ERK2 and PI3K/Akt/S6K pathways in *Xenopus* oocytes and induces Germinal Vesicle BreakDown (GVBD), similarly to progesterone (PG), the natural inducer of oocyte maturation. Additionally, it was observed that activated SmVKR1, but not SmVKR2, induces the phosphorylation of JNK [11]. Therefore, we analyzed the possible implication of the SmVKR1-SmShb axis in the activation of the JNK pathway. We first showed that the co-expression of SmShb with SmVKR1 blocked ERK2 and PI3K/Akt/S6K pathways and as a consequence GVBD in oocytes, without affecting JNK phosphorylation. The mutant form SmVKR1Y₉₇₉F was not sensitive to the presence of SmShb and activated all the pathways induced by SmVKR1, in agreement with its lack of binding to SmShb (shown in Fig 3 and 4). These results strongly suggested that SmShb could be involved in the activation of JNK pathway by SmVKR1. This conclusion was supported by the demonstration that the isolated SH2 domain of SmShb (SH2_{SmShb}) blocks the SmVKR1-dependent JNK activation, but has no effect on the JNK pathway elicited by the mutant SmVKR1Y₉₇₉F. In these conditions, it is supposed that the SH2 domain of SmShb blocks the access of

the endogenous SH2-containing proteins present in *Xenopus* oocytes and involved in JNK activation (Fig 5A, B). However, the main argument to affirm that the SmVKR-SmShb interaction induces JNK phosphorylation is brought by the capacity of SmVKR2 to activate JNK in the presence of SmShb in oocytes only if the receptor SmVKR2 F₉₄₉Y is modified in the juxtamembrane region and is able to bind SmShb (Fig 5C).

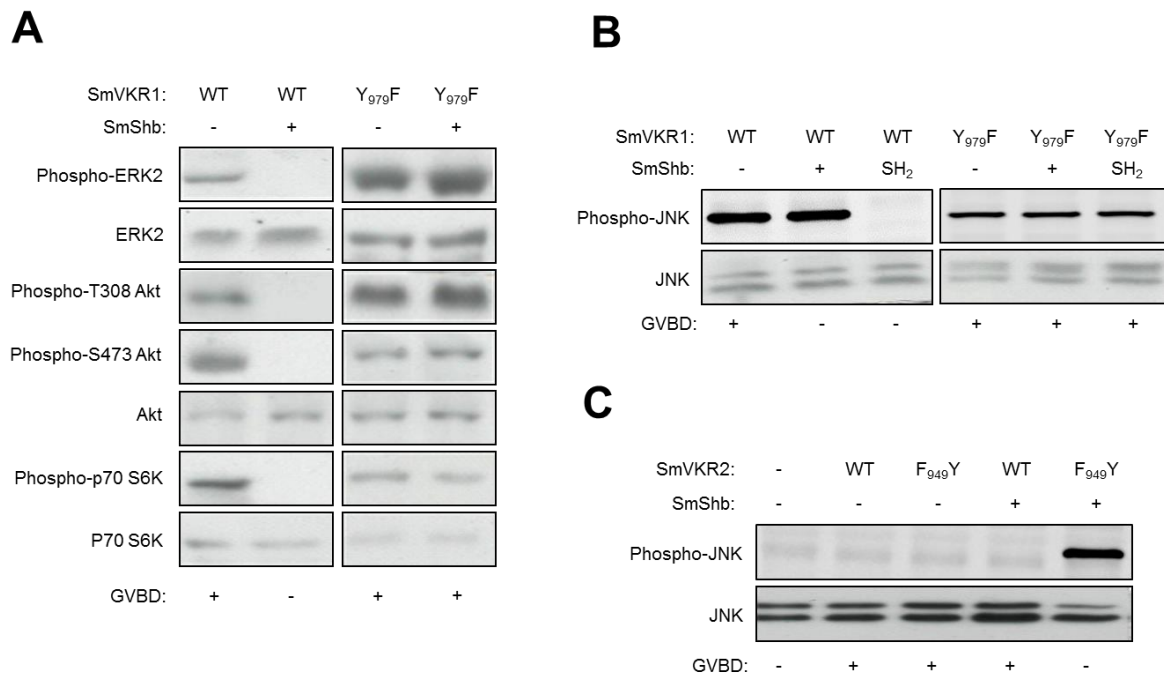


Figure 5: SmVKR-SmShb interaction induces JNK pathway

(A, B) *Xenopus* oocytes were co-injected with cRNAs encoding V5-SmVKR1 WT or Y₉₇₉F and SmShb and incubated in ND96 supplemented with 1μM L-Arginine. Oocyte lysates were analyzed by Western blot to detect the phosphorylation state of ERK2, Akt, S6K and JNK as described in Materials and Methods. In A, results show that SmShb blocks ERK2, Akt and S6K phosphorylation and GVBD induced by SmVKR1 but not by SmVKR1 Y₉₇₉F. In B, results show that the SH2 domain of SmShb, but not the total protein SmShb, inhibits JNK phosphorylation induced by SmVKR1 WT but not by SmVKR1 Y₉₇₉F. (C) *Xenopus* oocytes were co-injected with SmVKR2 WT or Y₉₄₉F and SmShb. Results confirm that wild type SmVKR2 does not activate JNK pathway in *Xenopus* oocytes [11] but they indicate that the mutant F₉₄₉Y which can bind SmShb (Fig 3) activates JNK in the presence of SmShb and that GVBD is blocked in these conditions. In all samples, GVBD was visualized in oocytes after 18h of incubation.

Localization and functions of SmShb in parasites

Previous studies have shown that *Smvkr1* is expressed in various tissues of all parasite stages [12,16] and particularly in the reproductive organs of male and female worms, with a more intense labelling in the mature oocytes present at the posterior part of the ovary [11]. Here, *in situ* hybridization showed that *SmShb* transcripts were also more detected in the mature part of the ovary (Fig 6A). Furthermore, *SmShb* transcripts were detected within the testicular lobes where signal intensity seems to be more pronounced in their dorsal parts (Fig 6B). A faint labelling is also detected

in other tissues, suggesting that *SmShb* is expressed ubiquitously in adult worms (Fig 6). Moreover, as it was already shown for *Smvkr1* [16], RT-PCR experiments indicated that the *SmShb* gene is more actively expressed in larval stages than in adult worms (results not shown).

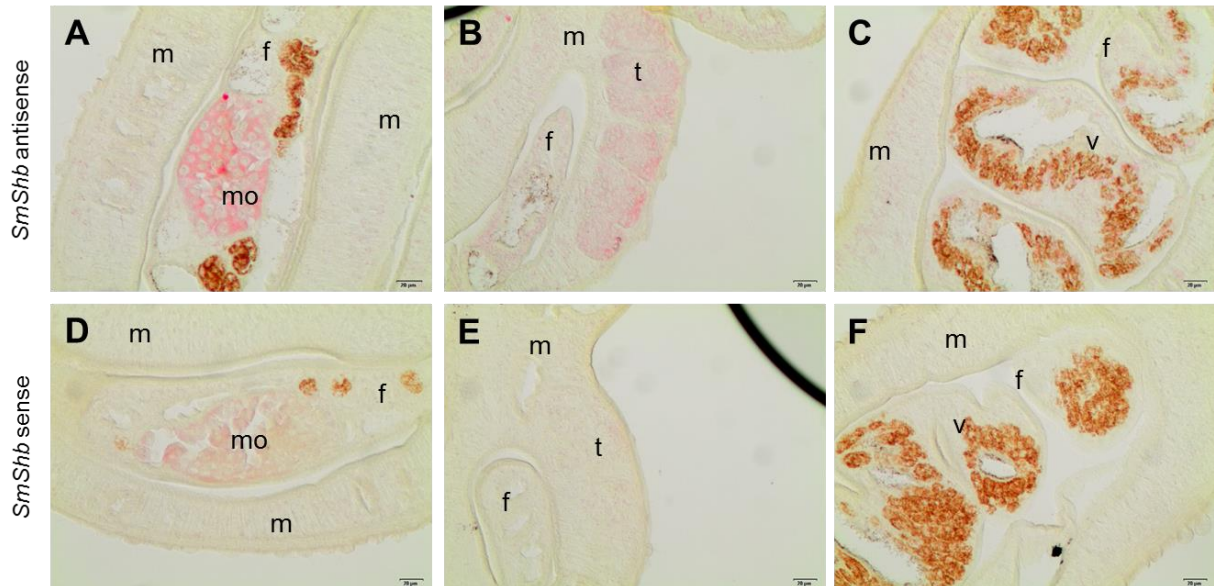


Figure 6: Localization of *SmShb* transcripts in sections of paired adult worms by *in situ* hybridization
SmShb transcripts were detected in mature oocytes (A), in testes (B) and lightly in the vitellarium (C). Sense probe of *SmShb* was used as control in D, E and F. (m: male; f: female; mo: mature oocytes; t: testes; v: vitellarium; scale bar = 20µm)

To analyse the function of *SmShb* in schistosome biology, we have used RNA interference (RNAi) to knock-down its expression in adult worms. Seven days after electroporation with dsRNA, a decrease of about 80% *SmShb* transcripts was obtained, as compared to control worms electroporated with irrelevant dsRNA (dsLuc) (Fig 7A). *SmShb* silencing had no impact on worm viability, pairing or egg laying. In *SmShb*-interfered female worms, phenotypic analysis by confocal laser scanning microscopy (CLSM) showed discrete alterations of ovary structures with a slight decrease of the number of cells. However, this phenotype was not similar to that previously obtained for *SmVKR1*-silenced female schistosomes in which an important disorganization of ovaries and abolishment of egg formation occurred [11]. In contrast, in males, *SmShb* silencing had a remarkable effect on testes. Compared to the control, huge accumulation of differentiated sperm was found within the testicular lobes of male worms (Fig 7B).

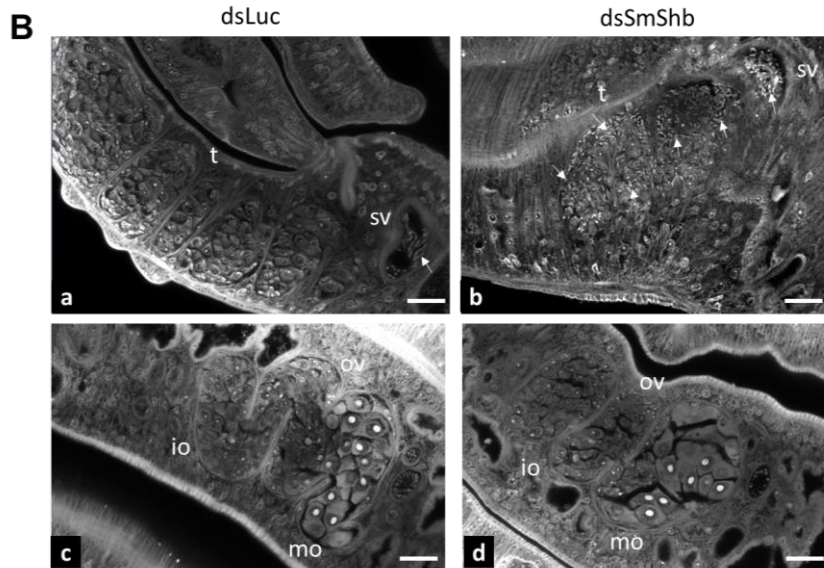
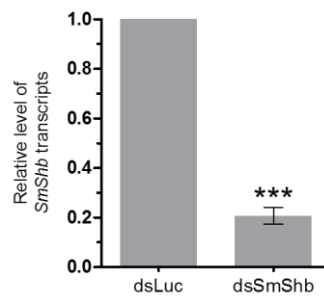
A

Figure 7: Effects of *SmShb* knock-down by RNA interference in adult worms

Worm couples were electroporated and incubated for 7 days either with *dsSmShb* or irrelevant *dsLuc* (control) as described in Materials and Methods. (A) Levels of *SmShb* transcripts were determined by quantitative RT-PCR in each worm sample. Interference led to a reduction of about 80% in the level of *SmShb* transcripts compared to controls. Statistical analysis was performed using the Student's t-test and values are expressed as mean \pm SEM of four determinations (***) $p < 0.001$). (B) CLSM images of whole-mount preparations of male (a, b) or female (c, d) worms issued from worm couples electroporated with *dsLuc* (a, c) or *dsSmShb* (b, d). Accumulation of sperm in testicular lobes is observed in *dsSmShb*-treated males (b). Less mature oocytes were present in the posterior part of the female ovary (d). (ov: ovary; mo: mature oocytes; io: immature oocytes; t: testes; sv: seminal vesicle; arrows indicates mature sperm; scale bar = 20 μ m)

Potential *SmShb* signaling partners

In order to go further in the functional characterization of *SmShb* and of its regulatory role in VKR signaling, we attempted to identify its potential interactors by screening a yeast *S. mansoni* adult cDNA library using the three-hybrid (Y-3H) technique. *SmShb* coupled to the active kinase *SmVKR1* ICD was used as a bait. This coupling was supposed to permit tyrosine phosphorylation of *SmShb* by the

SmVKR1 kinase and thus to allow trapping of SmShb partners potentially involved in phosphorylation cascades consecutive to SmVKR1-SmShb interaction.

A total of 165 β -galactosidase positive clones were selected, among which 73 were confirmed as potential protein partners and classified according to their putative functions (Table S1). Among the various potential SmShb partners, we found proteins already shown to interact with SmVKR1 [11] such as Prefoldin (involved in cytoskeleton arrangement), Notch and Cellular Acid Binding Protein (CNBP) (involved in gene regulation) and the proteolytic enzyme Cathepsin B endopeptidase.

In this work, three SmShb-interacting proteins have been highlighted due to their potential functions in JNK activation and/or germ cell development. The first one (CCD75535.1, Smp_025740) is similar to RhoU/Wrch1 (Wnt-responsive Cdc42 homolog), a Rho-GTPase involved in cellular adhesion, cytoskeleton dynamics and JNK activation [27,28]. Phylogenetic analyses indicate that this protein belongs to the RhoU/V subfamily inside of the cluster II of Rho proteins (Fig S2). As other Rho proteins, SmRhoU possesses a conserved GTPase catalytic domain and two domains, Switch I and II, for its interaction with regulators and effectors, as well as a specific insertion domain that differentiates Rho from Ras proteins. Following co-expression in *Xenopus* oocytes, we confirmed by Western blot analysis that SmShb co-immunoprecipitates with SmRhoU (data not shown). The second potential partner (CCD82914.1, Smp_143780) of SmShb exhibits homology to the dynein light chain t-complex associated testis expressed 1 (TcTex-1) protein. Besides its role related to dynein molecular motor in cargo transport along microtubules, TcTex-1 plays a role in sperm motility in mouse [29]. SmTcTex-1 is very similar to other TcTex-1 proteins (about 70% homology with mammal TcTex-1) and it contains the conserved threonine (T₉₄) which regulates interactions between TcTex-1 and other cellular proteins, independently of dynein complexes [30]. Finally, a component homolog to LSM14 proteins (CCD58382.1) was also identified as a potential partner of SmShb. LSM14 proteins include the CAR-1(cytokinesis/apoptosis/RNA binding) protein of *C. elegans* and xRAP55 of *Xenopus*, which are components of cytoplasmic messenger ribonucleoprotein complexes involved in germ cell development and oogenesis [31,32].

Discussion

Adaptor proteins are defined by their capacity to link membrane receptors to cytosolic proteins with enzymatic or transcriptional activation properties. Linking is mediated by diverse specific binding domains, like SH2 and PTB or SH3, which recognize phosphorylated tyrosines or poly-proline sequences, respectively. Shb is an adaptor protein containing an N-terminal Pro-rich domain, a central PTB domain and a C-terminal SH2 domain. The SH2 domain interacts with diverse phosphorylated RTKs preferentially at a pY-T/V/I-X-L binding site [22]. In contrast, the Pro-rich domain can recruit SH3-containing proteins like Src, p85 PI3K, Plc β , c-Abl, Janus Kinase (JAK), Grb2 or Eps8. Tyrosine phosphorylation of Shb in turn generates binding sites for other SH2-containing partners making Shb an essential platform to transduce various cellular signals [20].

Shb proteins are ubiquitously expressed and generate variable complexes depending on the cell type and on the conditions of cell activation. Therefore they have unique effects either in differentiation, proliferation, survival or motility [19,20]. The Shb SH2 domain binds to PDGF-R [22], FGFR-1 [33], VEGFR-2 [34], NGF-R [35] to regulate apoptosis, proliferation, cell migration and differentiation respectively in fibroblasts, endothelial and neuronal cells through the modulation of Ras/MEK/MAPK and PI3K kinase pathways. Shb can modulate c-Abl pro-apoptotic signaling in response to stress stimuli by interacting with SH2 and SH3 domains of the Abl kinase and regulating its activity [36]. In mouse embryonic stem cells, the absence of Shb impairs various aspects of differentiation, suggesting a role of Shb in development [37,38].

Transgenic mice deficient in the Shb gene exhibit impairment of glucose homeostasis due to a decrease of insulin secretion [20,39], hematopoietic disorders [40,41] and abnormalities in reproduction linked to increased ERK/S6K signaling in ovary cells [42].

While much is known about the various physiological roles of Shb in mammals [20], the functions of Shb orthologs in invertebrates, have not been studied yet. This paper presents i) the first characterization of an invertebrate Shb protein expressed by a platyhelminth parasite, ii) its interaction with an unusual RTK, the VKR, which specifically occurs in invertebrates, iii) the demonstration for the first time of the ability of Shb to induce JNK activation, iv) the hypothesis that this pathway could be involved in gamete mobility and thus in parasite reproduction.

Since their first discovery in 2003 [12], VKRs have been identified in various organisms and shown to be expressed in larval stages and gonads of several animal species such as schistosome, sea urchin, mosquito or honeybee [12–14]. Recent advances in the understanding of VKR functions demonstrated their importance for reproduction in the *S. mansoni* parasite and in the insect *Aedes aegypti* [43]. However, a better understanding of the mechanisms by which activated VKRs transduce

signaling was required and accordingly, we have attempted to characterize downstream partners of *S. mansoni* VKR.

SmShb was identified as a specific interacting partner of SmVKR1 by Y2H screening [11]. It has a structure similar to other proteins of the Shb family, with the exception of the PTB domain, a sequence demonstrated to interact with the FAK focal adhesion kinase [19], which was not identified. Phylogenetic analyses however, confirmed that SmShb belongs to the Shb family and is distinct from Shc, Grb2, Grb7 or Nck proteins which represent other SH2-containing adaptors largely recognized for their capacity to bind to activated RTKs and for their involvement in signaling. In this work, we demonstrated that SmShb binds to the juxtamembrane sequence of the receptor SmVKR1 *via* its SH2 domain and that this interaction induces JNK signaling in *Xenopus* oocytes.

First experiments were performed to analyse the capacity of SmShb to interact with various known RTKs of *S. mansoni*, ie SmVKR1, SmVKR2, SmIR1, and SmIR2, expressed either in their normal or in their active kinase states. The results showed that the intracellular domain of the constitutively active SmVKR1 kinase was the only one to offer SmShb binding sites. Identical results were obtained from the yeast interaction studies or by co-immunoprecipitation of the proteins expressed in *Xenopus* oocytes. We also provided evidence that the specific binding of SmShb to the phosphorylated form of SmVKR1 was mediated by its SH2 domain. The SH2_{SmShb} polypeptide was shown to bind to SmVKR1.

In order to precisely define the site of interaction between SmVKR1 and SmShb, we mapped the phosphorylatable tyrosines present within the SmVKR1 intracellular sequence and susceptible to be part of the consensus motif pYxxL, to which the Shb SH2 domain binds [22]. Only one motif (Y₉₇₉ENL) fitted to this consensus, located just behind the transmembrane domain of SmVKR1. Mutagenesis experiments allowed us to identify the Y₉₇₉ amino acid as a crucial residue for the interaction between phosphorylated SmVKR1 and SmShb and we further confirmed the importance of this residue for SmVKR-SmShb signaling. Indeed, whereas SmVKR2 (which possesses a juxtamembrane F₉₄₉EEL in place of the Y₉₇₉ENL of SmVKR1) does not effectively interact with SmShb, we showed that the replacement of F₉₄₉ by a tyrosine residue is sufficient to allow the binding of SmShb to SmVKR2. SmShb was also shown to be an effective substrate of both SmVKR1 and SmVKR2 kinases. These data indicated that a juxtamembrane motif pYExL in SmVKR would be necessary and sufficient to allow interaction with SmShb. This was in agreement with the observation that SmIR1 and SmIR2 insulin receptors which do not possess a similar motif in their juxtamembrane regions do not bind SmShb. However, it is interesting to mention that the activated *Schistosoma* EGF receptor (SER) which contains, similarly to SmVKR1, a juxtamembrane YxxL (YTNL) motif as well does not bind SmShb (results not shown). This suggests that the second residue E is required for SH2_{SmShb} binding. Additionally, the interaction between SmShb and SmVKRs could require the participation of specific residues surrounding the

phosphorylated tyrosine like proline at -1 position and cysteine at +4 position. Indeed, these residues are common to SmVKR1 (PpYENLC) and mutated F₉₄₉Y SmVKR2 (PpYEELC) but they are not present in SER (ApYTNLL). Further experiments are still necessary to fully define the binding site of SmShb on SmVKRs, and to check for possible interaction of this adaptor protein with other RTKs already characterized in *S. mansoni*, and particularly with FGF-R receptors [44]. As mammal Shb proteins can interact with diverse RTKs [20], we cannot exclude that SmShb interacts as well with other schistosome RTKs. With respect to the specificity of the binding between Shb and VKR in different species, it seems that Shb proteins are specifically adapted to their VKRs. Experiments performed with AgVKR from the mosquito *A. gambiae* indicated that the insect RTK was not able to interact with SmShb and inversely we showed that the SH2 domain of AgShb (XP_309808.4), which shares about 40% homology with SH2_{SmShb}, interacts with AgVKR but not with SmVKR1 (results not shown).

In a previous study we have demonstrated, in *Xenopus* oocytes, that activation of SmVKR1 and SmVKR2 induces ERK2 and PI3K/Akt/S6K pathways and that only SmVKR1 induces the phosphorylation of JNK [11]. In this work, we have demonstrated that following its interaction with SmVKR1, SmShb activates the JNK pathway. First, we showed that co-expression of SmShb and SmVKR1 in *Xenopus* oocytes orientates SmVKR1 signaling towards the JNK pathway, with the consequence of a blockade of ERK and PI3K pathways and the subsequent inhibition of meiosis resumption in the oocyte. SH2_{SmShb} blocked the SmVKR1-dependent JNK activation, but had no effect on the JNK pathway elicited by the mutant SmVKR1Y₉₇₉F. Inversely, JNK phosphorylation was induced during SmVKR2 signaling only when SmShb was co-expressed with the mutated F₉₄₉Y SmVKR2 but not with its wild-type form. This strongly suggested that JNK activation could be dependent on SmVKR1-SmShb interaction during SmVKR1 signaling in parasites. To our knowledge, the participation of Shb in the activation of JNK has not yet been shown in mammalian cells, but its function in the regulation of ERK and Akt signaling has been described by the group of Welsh in Shb-deficient mice [20]. The loss of Shb provoked an increase of ERK or Akt signaling in different cells, suggesting that Shb could facilitate cell differentiation by modulating negatively ERK and Akt activation. Consistently, our results confirm a function of SmShb in the inhibition of the two predominant VKR pathways which are ERK and Akt signaling.

SmVKR1 and SmShb were shown to be expressed in all parasite stages with a more important quantity of transcripts detected in larval stages as compared to adult parasites. However, both types of transcripts were co-localized in reproductive organs (mature oocytes and testes) of *S. mansoni*, suggesting that SmVKR1 and Shb proteins could interact within gametes. However, *SmShb* silencing in adult worm pairs did not provide solid morphological arguments for a decisive role of SmVKR1-SmShb interaction in the ovary. Knocking-down SmVKR1 had shown an accumulation of big oocytes [11], which was not as obvious in ovaries of *SmShb*-silenced females. However, *SmShb* knock-down led to

an accumulation of differentiated male gametes in schistosome testes, a phenotype which was not observed before in *SmVKR1*-silenced males [11]. VKRs, as many other RTKs, exert pleiotropic functions and induce the activation of various signaling pathways controlling metabolism, growth and differentiation. Moreover, Shb proteins, whose expression has been shown to be tightly controlled in cells [20], are multifaceted signaling partners for diverse RTKs and their platform-based activities are strictly dependent on the cellular context including receptor activation and tissue- and stage-dependent expression of potential binding partners. This is supported by the identification in our studies of many proteins which are potential partners of SmShb and whose identities reveal their functions in various biological processes. This in turn explains that the congruence of *Smvkr1* and *SmShb* RNAi phenotypes is small. Nonetheless, RNAi results provided a first view on SmShb function, which is associated with gametogenesis.

Among the *SmVKR1*-interacting molecules selected by the Y2H technique [11], we already identified several proteins potentially implied in JNK pathway, such as SmMEK7, a JNK activating kinase, and SmPP2C potentially involved in the inactivation of JNK [45] as well as the protein SmRho1, a Rho-GTPase homologous to human RhoA, localized in parasite reproductive organs and implied in cytoskeleton modelling [46]. Here, we showed that SmRhoU, an atypical Rho family member with high homology to Cdc42 being involved in cytoskeletal remodeling, can potentially interact with SmShb as further part of a *SmVKR1*-SmShb complex. RhoU has been shown to physically interact with the receptor tyrosine kinase EGFR in a Grb2-dependent manner and to be involved in EGFR-mediated signaling leading to JNK/AP-1 transcriptional activity and cell migration in pancreatic cancer cells [28]. Thus, we postulate that interaction of SmRhoU with the adaptor SmShb might be integrated in *SmVKR1* signaling for its role in JNK/AP-1 activation. Two other partners for SmShb were identified, which are known for their main functions in membrane trafficking, a putative kinesin and a light chain of dynein SmTcTex-1. TcTex-1 was originally described as a small gene family within the murine t complex and shown to be involved in sterility [47]. TcTex1 is present in mouse sperm [48] and in *Drosophila*, it is necessary for male fertility [49]. These data support the view of a particular role of SmShb in the activation of a JNK pathway possibly required for cytoskeletal remodelling and gametogenesis.

As a partner and substrate of *SmVKR1*, SmShb can potentially recruit other SH2-containing proteins through its specific consensus binding motifs. For example, its motif Y₁₇₂ENL could be a binding site for the SmTK3 Src kinases, Y₂₇₈LSP a site for the SmTK6 Abl-like kinase, two kinases already suggested to participate in a *SmVKR1* complex in reproductive organs of *S. mansoni* [50]. Furthermore, SmShb contains also a potential binding site Y₁₇₉LLM for the regulatory subunit of PI3K [51], which could be putatively involved in its regulatory role of *SmVKR1*-dependent PI3K/Akt pathway observed

in *Xenopus* oocytes. Moreover, as already shown for mammal Shb proteins [19], SmShb could also recruit SH3-containing proteins by its proline-rich domains, and particularly Src and PI3K kinases.

In conclusion, SmShb appears to be a component of a signal transduction platform formed by activated SmVKR1, and other molecules involved for some of them in cytoskeletal modelling. SmShb interactions orientate SmVKR1 signaling towards a JNK pathway possibly to modulate ERK- and Akt-dependent metabolism and proliferation pathways, in favour of cell differentiation and development pathways. SmShb and SmVKR1 are expressed in all the stages of the parasite and future studies will aim to unravel the importance of these two partner proteins for larval stages of *S. mansoni*.

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 (authorization 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* is maintained by passage through albino *Biomphalaria glabrata* snails and *Mesocricetus auratus* golden hamsters. Adult schistosome pairs were collected by portal perfusion from infected hamsters at 42–45 days post infection.

Molecular cloning of SmShb

Total RNA of adult schistosomes was isolated using the RiboPure™ RNA Purification Kit. cDNA was prepared using the GeneRacer™ Kit with the SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. 5' and 3' ends of SmShb were determined by RACE PCR using GeneRacer™ 5', 3', 5' Nested and 3' Nested primers associated with SmShb-specific primers (Table S2). Amplified products were subcloned into pCR™4-TOPO® vector and sequenced (EurofinsDNA). The full-length (FL) SmShb sequence was then amplified using SH2protFLf/SH2protFLr primers (table S2) and cloned into a pCR™4-TOPO® vector. A second PCR was performed using SmShbFLRef/SmShbFLREr primers containing ClaI and XhoI restriction sites respectively and the obtained fragment was inserted into a pCR™4-TOPO® vector (SmShb-pCR™4-TOPO®).

In silico analyses and phylogenetic studies

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

Shb, Grb2, Grb7, Nck and Shc protein sequences were aligned using ClustalW algorithm in the BioEdit v7.2.5 software, and manually corrected. Maximum likelihood tree was built using MEGA6 [52] under the JTT+G+I model, with 1000 bootstrap repetitions.

Plasmid constructs

SmShb-pCR™4-TOPO® was cut by ClaI and XhoI and the SmShb sequence was inserted in frame into the pGADT7 AD expression vector (Clontech) using the T4 DNA Ligase (Invitrogen™) (SmShb-PGADT7). Alternatively, the SmShb sequence was excised from the SmShb-pGADT7 construct using SmaI and PstI enzymes and inserted into the MCS I of the pBridge™ expression vector (Clontech). The intracellular kinase active domain of SmVKR1 (SmVKR1 ICD YYRE) amplified from SmVKR1 YYRE-pcDNA plasmid [16] using SmVKR1REpBr-f and SmVKR1REpBr-r primers, was further inserted into the MCS II of SmShb-pBridge construct to obtain SmShb-SmVKR1 pBridge.

The SH2 domain, amplified from SmShb-PGADT7 using SH2domainf/SmShbFLREr primers containing respectively EcoRI and XhoI sites, was inserted in frame into the pGADT7 AD expression vector.

Site-directed mutagenesis of constructs was performed using the Isis DNA polymerase™ (MP Biomedicals). The SmShb-pGADT7 construct was used as a template for the production of SmShb^{ΔSH2} mutant using as primers SmShbdeISH2f/SmShbdeISH2r in which G₃₃₁₀ is replaced by T to generate a stop codon and to create the SmShb^{ΔSH2} variant (AA sequence 1- 1048).

SmVKR1-pcDNA and SmVKR1 ICD YYRE-pGBKT7 plasmids [16,21] were used as templates to generate SmVKR1 Y₉₇₉F mutants using SmVKR1Y979Ff/SmVKR1Y979Fr as primers. The SmVKR2 F₉₄₉Y mutant was obtained similarly from the SmVKR2-pcDNA plasmid [16] using the SmVKR2F949Yf/SmVKR2F949Yr as primers.

Direct Y2H interaction studies

Intracellular domains (ICD) of constitutively active SmVKRs (SmVKR1YYRE and SmVKR2YYRE) and of *S. mansoni* insulin receptors (SmIR1YYRE and SmIR2YYHE) were inserted in fusion with the Gal4-BD of the pGBKT7 plasmid [21] and used to transform Y187 yeasts using the Lithium acetate method which were plated on selective growth media, as described in the Yeast Protocols Handbook (Clontech). SmShb-PGADT7 was used to transform AH109 cells. Mating between Y187 and AH109 cells was performed and diploid yeasts were selected on stringent quadruple dropout medium, SD-Leu/-Trp/-His/-Ade.

Yeast cDNA library screening

Y187 yeasts transformed with the SmShb-SmVKR1 pBridge plasmid were mated with the *S. mansoni* library constructed in pGADT7 (Gal4-AD-containing) vector and amplified in AH109 cells, as described previously [46]. Diploid yeasts were selected on SD-Leu/-Trp/-His/-Ade medium. Yeast clones were submitted to the beta-galactosidase filter assay using X-Gal substrate, following

manufacturer's instructions (Yeast Protocols Handbook, Clontech). Positive clones were amplified, yeasts were lysed with glass beads (Sigma) and plasmid DNA was extracted using the NucleoSpin® Plasmid QuickPure kit (Macherey Nagel). Plasmid DNA was used to transform chemically competent DH5 α bacteria (Invitrogen). Two successive rounds of plating on ampicillin-containing plates were performed to select bacteria containing pGADT7-Rec plasmids. Insert sequences were analyzed and prey proteins identified using the BLASTn tool.

Analysis of proteins expressed in *Xenopus laevis* oocytes

cRNAs encoding SmVKR and SmShb variant proteins were synthesized *in vitro* using the mMessage mMachine® T7 Kit (Ambion, USA) from pcDNA, pGBKT7 and pGADT7 plasmid constructs digested by PmeI (pcDNA) or by HindIII (pGBKT7 and pGADT7) restriction enzymes. cRNA solutions (1 mg/mL) were injected in stage VI *Xenopus laevis* oocytes according to the procedure previously described [53]. Kinase activation of full-length SmVKR receptors was obtained by the addition of external ligands (arginine, Ca) in the incubation medium [16]. Germinal Vesicle BreakDown (GVBD) was detected after 15h by the appearance of a white spot at the centre of the animal pole.

Immunoprecipitation of proteins was performed according to the procedures described previously [53]. Following 5 h of expression, oocytes were lysed in buffer A (50 mM Hepes pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% SDS, 5 mM MgCl₂, 1 mg ml⁻¹ bovine serum albumin, 10 μ g ml⁻¹ leupeptin, 10 μ g ml⁻¹ aprotinin, 10 μ g ml⁻¹ soybean trypsin inhibitor, 10 μ g ml⁻¹ 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. Membrane extracts were incubated with anti-V5, anti-Myc or anti-HA antibodies (1:100; Invitrogen) overnight at 4°C and immune complexes were precipitated on protein A-Sepharose beads and analyzed by Western blotting using anti-V5 (1:50,000), anti-Myc (1:50,000), anti-HA (1:50,000) or PY20 (1:10,000; anti-phosphotyrosine, BD Biosciences) antibodies and the advanced ECL detection system (Amersham Biosciences) as previously described [11].

Immunoprecipitation of SmVKR ICD variants was performed from soluble extracts of oocytes lysed in buffer A containing 0.5% Triton X-100 and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C, in the same conditions as above. In some experiments, soluble extracts were used to analyse the phosphorylation cascades induced by SmVKR in oocytes. Total cell lysates were analyzed by Western blotting using anti-ERK2, anti-Akt, anti-p70S6K and anti-JNK and their phosphorylated proteins exactly as previously described [11].

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 (5 µm) were incubated in xylol to remove paraplast. Following rehydration, slides were treated with proteinase K (1 µg/ml) and sections dehydrated. For hybridization, *in vitro* transcripts (corresponding to nt 616-1082 sequence of SmShb (Genbank accession: JN864885)) 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 [46]. Sections were washed in 0,5×SSC (75 mM NaCl, 7.5 mM sodium citrate, pH 7) and detection of alkaline phosphatase on slides was achieved as described above.

RNAi experiments

cDNA fragments of SmShb (610 bp) and Luciferase (357 bp, control) were generated by PCR using respectively the SmShb-pGADT7 plasmid or the pGL3-basic plasmid (Promega) as templates and SmShbRNAiT7f/ SmShbRNAiT7r and LucT7f/LucT7f as primers (Table S2).

dsRNA were prepared using the Megascript RNAi kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions and quantified spectrophotometrically (NanoVue Plus™, GE Healthcare). Eight worm couples were placed in 4mm cuvette with 100 µL of M199 medium containing 25 µg of dsRNA and electroporated using the square-wave protocol already described [54] with a single impulse of 125 V during 20 ms. Worms were then incubated in 2.5 mL of complete M199 medium (supplemented with 10% SVF, 10 mM HEPES pH 7.4, 60 µg/ml Rifampicin and 50 U penicillin/streptomycin) at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. After 7 days, 5 worm couples were picked up for CLSM examination and knock-down of gene expression was monitored by quantitative RT-PCR in the remaining worms.

Quantitative RT-PCR experiments

Total RNA was extracted from worm couples using TRIzol® reagent (Invitrogen) and reverse transcription was performed using the Superscript III RT-PCR System (Invitrogen). cDNA was used as template for PCR amplification using KAPA SYBR® FAST Universal 2× qPCR Master Mix kit (Clontech) and the ABI PRISM 7300 detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). SmShbqPCRf/SmShbqPCRr primers (Table S2) were used to amplify SmShb cDNA in triplicate assays. Tubulin cDNA (GenBank Acc N°M80214) was amplified with SmTubulinqPCRf/ SmTubulinqPCRr

primers and used as an internal control. For graphical representation, the delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) method was applied [55] to compare SmShb expression in dsSmShb interfered worms to control dsLuc treated parasites. Statistical significance of SmShb knock-down was evaluated using Student's t-test in the GraphPad Prism program (GraphPad Software Inc.).

CLSM examination of parasites

Worms fixed in AFA (ethanol 95%, formalin 3% and glacial acetic acid 2%) 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, worms were preserved as whole-mounts in Canada balsam (Merck) on glass slides [56–58]. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images were taken using a Leica LSM780 microscope with a 488 nm He/Ne laser and a 470 nm long-pass-filter under reflection mode.

References

1. WHO | Schistosomiasis. World Health Organization; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>
2. Ross AGP, Bartley PB, Sleigh AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, et al. Schistosomiasis. *N Engl J Med*. 2002;346: 1212-20. doi:10.1056/NEJMra012396
3. Doenhoff MJ, Pica-Mattocchia L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2006;4: 199-210. doi:10.1586/14787210.4.2.199
4. Pica-Mattocchia L, Doenhoff MJ, Valle C, Basso A, Troiani A-R, Liberti P, et al. Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop*. 2009;111: 82-5. doi:10.1016/j.actatropica.2009.01.012
5. Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21: 659-667. doi:10.1097/QCO.0b013e328318978f
6. Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3: e504. doi:10.1371/journal.pntd.0000504
7. Lemmon M a., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141: 1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
8. Dissous C, Ahier A, Khayath N. Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *Bioessays*. 2007;29: 1281-8. doi:10.1002/bies.20662
9. Morel M, Vanderstraete M, Hahnel S, Grevelding CG, Dissous C. Receptor tyrosine kinases and schistosome reproduction: new targets for chemotherapy. *Front Genet. Frontiers*; 2014;5: 1-5. doi:10.3389/fgene.2014.00238
10. Gelmedin V, Dissous C, Grevelding CG. Re-positioning protein-kinase inhibitors against schistosomiasis. *Future Med Chem*. 2015;7: 737-52. doi:10.4155/fmc.15.31
11. Vanderstraete M, Gouignard N, Cailliau K, Morel M, Hahnel S, Leutner S, et al. Venus kinase receptors control reproduction in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog*. 2014;10: e1004138. doi:10.1371/journal.ppat.1004138
12. Vicogne J, Pin J-PP, 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;126: 51-62. doi:10.1016/S0166-6851(02)00249-9
13. Ahier A, Rondard P, Gouignard N, Khayath N, Huang S, Trolet J, et al. A new family of receptor tyrosine kinases with a venus flytrap binding domain in insects and other invertebrates activated by aminoacids. *PLoS One*. 2009;4: e5651. doi:10.1371/journal.pone.0005651
14. Vanderstraete M, Gouignard N, Ahier A, Morel M, Vicogne J, Dissous C. The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. *BMC Genomics*. 2013;14: 361. doi:10.1186/1471-2164-14-361
15. Vogel KJ, Brown MR, Strand MR. Ovary ecdysteroidogenic hormone requires a receptor tyrosine kinase to activate egg formation in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112: 5057-62. doi:10.1073/pnas.1501814112
16. 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;132: 32-9. doi:10.1016/j.exppara.2011.05.007

17. Dissous C, Morel M, Vanderstraete M. Venus kinase receptors: prospects in signaling and biological functions of these invertebrate kinases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5: 72. doi:10.3389/fendo.2014.00072
18. Welsh M, Mares J, Karlsson T, Lavergne C, Bréant B, Claesson-Welsh L. Shb is a ubiquitously expressed Src homology 2 protein. *Oncogene*. 1994;9: 19-27.
19. Annerén C, Lindholm CK, Kriz V, Welsh M. The FRK/RAK-SHB signaling cascade: a versatile signal-transduction pathway that regulates cell survival, differentiation and proliferation. *Curr Mol Med*. 2003;3: 313-24.
20. Welsh M, Jamalpour M, Zang G, Åkerblom B. The role of the Src Homology-2 domain containing protein B (SHB) in β cells. *J Mol Endocrinol*. 2016;56: R21-31. doi:10.1530/JME-15-0228
21. Vanderstraete M, Gougnard N, Cailliau K, Morel M, Lancelot J, Bodart J-F, et al. Dual targeting of insulin and venus kinase Receptors of *Schistosoma mansoni* for novel anti-schistosome therapy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7: e2226. doi:10.1371/journal.pntd.0002226
22. Karlsson T, Songyang Z, Landgren E, Lavergne C, Di Fiore PP, Anafi M, et al. Molecular interactions of the Src homology 2 domain protein Shb with phosphotyrosine residues, tyrosine kinase receptors and Src homology 3 domain proteins. *Oncogene*. 1995;10: 1475-83.
23. Oda T, Kujovich J, Reis M, Newman B, Druker BJ. Identification and characterization of two novel SH2 domain-containing proteins from a yeast two hybrid screen with the ABL tyrosine kinase. *Oncogene*. 1997;15: 1255-62. doi:10.1038/sj.onc.1201299
24. Lindholm CK, Frantz JD, Shoelson SE, Welsh M. Shf, a Shb-like adapter protein, is involved in PDGF-alpha-receptor regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278: 537-43. doi:10.1006/bbrc.2000.3847
25. Pawson T, Gish GD, Nash P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol*. 2001;11: 504-11.
26. Welsh M, Songyang Z, Frantz JD, Trüb T, Reedquist KA, Karlsson T, et al. Stimulation through the T cell receptor leads to interactions between SHB and several signaling proteins. *Oncogene*. 1998;16: 891-901. doi:10.1038/sj.onc.1201607
27. Tao W, Pennica D, Xu L, Kalejta RF, Levine AJ. Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev*. 2001;15: 1796-807. doi:10.1101/gad.894301
28. Zhang J-S, Koenig A, Young C, Billadeau DD. GRB2 couples RhoU to epidermal growth factor receptor signaling and cell migration. *Mol Biol Cell*. 2011;22: 2119-30. doi:10.1091/mbc.E10-12-0969
29. Korrodi-Gregorio L, Vieira SI, Esteves SLC, Silva J V., Freitas MJ, Brauns A-K, et al. TCTEX1D4, a novel protein phosphatase 1 interactor: connecting the phosphatase to the microtubule network. *Biol Open*. 2013;2: 453-465. doi:10.1242/bio.20131065
30. Yeh C, Li A, Chuang J-Z, Saito M, Cáceres A, Sung C-H. IGF-1 activates a cilium-localized noncanonical G β signaling pathway that regulates cell-cycle progression. *Dev Cell*. 2013;26: 358-68. doi:10.1016/j.devcel.2013.07.014
31. Boag PR. A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. *Development*. 2005;132: 4975-4986. doi:10.1242/dev.02060
32. Tanaka KJ, Ogawa K, Takagi M, Imamoto N, Matsumoto K, Tsujimoto M. RAP55, a cytoplasmic mRNP component, represses translation in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 2006;281: 40096-106. doi:10.1074/jbc.M609059200

33. Cross MJ, Lu L, Magnusson P, Nyqvist D, Holmqvist K, Welsh M, et al. 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;13: 2881-93. doi:10.1091/mbc.E02-02-0103
34. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hägerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, et al. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem*. 2004;279: 22267-75. doi:10.1074/jbc.M312729200
35. Lu L, Annerén C, Reedquist KA, Bos JL, Welsh M. NGF-Dependent neurite outgrowth in PC12 cells overexpressing the Src homology 2-domain protein shb requires activation of the Rap1 pathway. *Exp Cell Res*. 2000;259: 370-7. doi:10.1006/excr.2000.4984
36. Hägerkvist R, Mokhtari D, Lindholm C, Farnebo F, Mostoslavsky G, Mulligan RC, et al. Consequences of Shb and c-Abl interactions for cell death in response to various stress stimuli. *Exp Cell Res*. 2007;313: 284-91. doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.011
37. Funa NS, Saldeen J, Akerblom B, Welsh M. Interdependent fibroblast growth factor and activin A signaling promotes the expression of endodermal genes in differentiating mouse embryonic stem cells expressing Src Homology 2-domain inactive Shb. *Differentiation*. 2008;76: 443-53. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00249.x
38. Kriz V, Agren N, Lindholm CK, Lenell S, Saldeen J, Mares J, et al. The SHB adapter protein is required for normal maturation of mesoderm during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2006;281: 34484-91. doi:10.1074/jbc.M604084200
39. Akerblom B, Barg S, Calounova G, Mokhtari D, Jansson L, Welsh M. Impaired glucose homeostasis in Shb^{-/-} mice. *J Endocrinol*. 2009;203: 271-9. doi:10.1677/JOE-09-0198
40. Gustafsson K, Calounova G, Hjelm F, Kriz V, Heyman B, Grönvik K-O, et al. Shb deficient mice display an augmented TH2 response in peripheral CD4⁺ T cells. *BMC Immunol*. 2011;12: 3. doi:10.1186/1471-2172-12-3
41. Gustafsson K, Willebrand E, Welsh M. Absence of the adaptor protein Shb potentiates the T helper type 2 response in a mouse model of atopic dermatitis. *Immunology*. 2014;143: 33-41. doi:10.1111/imm.12286
42. Calounova G, Livera G, Zhang X-Q, Liu K, Gosden RG, Welsh M. The Src homology 2 domain-containing adapter protein B (SHB) regulates mouse oocyte maturation. *PLoS One*. 2010;5: e11155. doi:10.1371/journal.pone.0011155
43. Dissous C. Venus Kinase Receptors at the Crossroads of Insulin Signaling: Their Role in Reproduction for Helminths and Insects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6: 118. doi:10.3389/fendo.2015.00118
44. Hahnel S, Quack T, Parker-Manuel SJ, Lu Z, Vanderstraete M, Morel M, et al. Gonad RNA-specific qRT-PCR analyses identify genes with potential functions in schistosome reproduction such as SmFz1 and SmFGFRs. *Front Genet*. 2014;5: 170. doi:10.3389/fgene.2014.00170
45. Baril C, Sahmi M, Ashton-Beaucage D, Stronach B, Therrien M. The PP2C Alphabet is a negative regulator of stress-activated protein kinase signaling in *Drosophila*. *Genetics*. 2009;181: 567-79. doi:10.1534/genetics.108.096461
46. 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;4: e6998. doi:10.1371/journal.pone.0006998
47. Lader E, Ha HS, O'Neill M, Artzt K, Bennett D. *tctex-1*: a candidate gene family for a mouse t complex sterility locus. *Cell*. 1989;58: 969-79.

48. Harrison A, Olds-Clarke P, King SM. Identification of the t complex-encoded cytoplasmic dynein light chain tctex1 in inner arm I1 supports the involvement of flagellar dyneins in meiotic drive. *J Cell Biol.* 1998;140: 1137-47.
49. Caggese C, Moschetti R, Ragone G, Barsanti P, Caizzi R. dtctex-1, the *Drosophila melanogaster* homolog of a putative murine t-complex distorter encoding a dynein light chain, is required for production of functional sperm. *Mol Genet Genomics.* 2001;265: 436-44.
50. Beckmann S, Hahnel S, Cailliau K, Vanderstraete M, Browaeys E, Dissous C, et al. Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 2011;286: 42325-36. doi:10.1074/jbc.M110.210336
51. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell.* 1993;72: 767-78.
52. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30: 2725-9. doi:10.1093/molbev/mst197
53. Vicogne J, Cailliau K, Tulasne D, Browaeys E, Yan YT, Fafeur V, et al. Conservation of Epidermal Growth Factor Receptor Function in the Human Parasitic Helminth *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 2004;279: 37407-37414. doi:10.1074/jbc.M313738200
54. Krautz-Peterson G, Bhardwaj R, Faghiri Z, Tararam CA, Skelly PJ. RNA interference in schistosomes: machinery and methodology. *Parasitology.* 2010;137: 485-95. doi:10.1017/S0031182009991168
55. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001;25: 402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262
56. Beckmann S, Quack T, Burmeister C, Buro C, Long T, Dissous C, et al. *Schistosoma mansoni*: signal transduction processes during the development of the reproductive organs. *Parasitology.* 2010;137: 497-520. doi:10.1017/S0031182010000053
57. Neves RH, De Lamare Biolchini C, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Branquinho TB, Lenzi HL, et al. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitol Res.* Springer-Verlag; 2005;95: 43-49. doi:10.1007/s00436-004-1241-2
58. Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93 Suppl 1: 303-7.

Supplementary Figure 1.

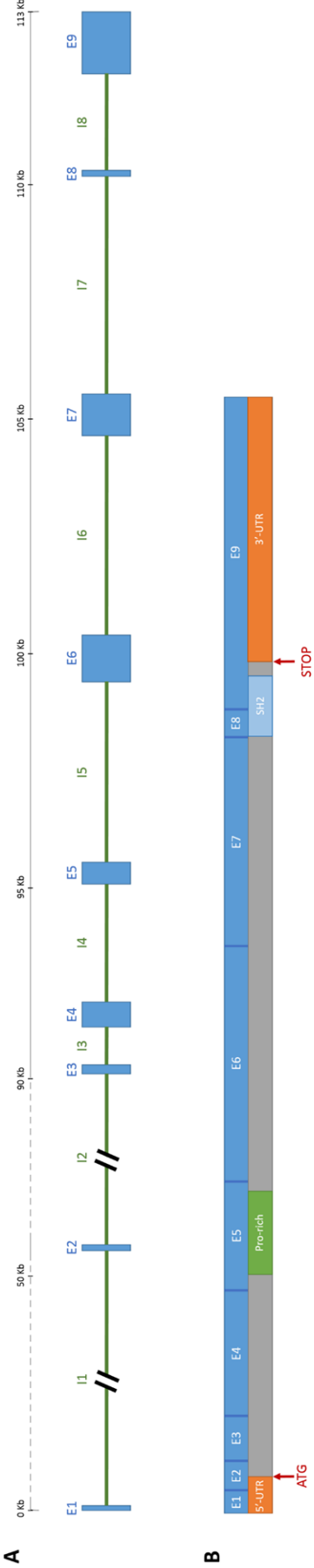


Figure S1: Gene organization of *SmShb*

(A) Exon-intron structure of *SmShb* locus. Exons are shown as blue boxes and introns as green lines. Size scale is identical for introns and exons, except for I1 and I2 (larger than 30kb).

(B) Schematic representation of the *SmShb* transcript indicating the coding sequence (in grey) with the Proline-rich domain in green and the SH2 domain in light blue. Untranslated regions (5'- and 3'-UTR) are indicated in orange.

Supplementary Figure 2.

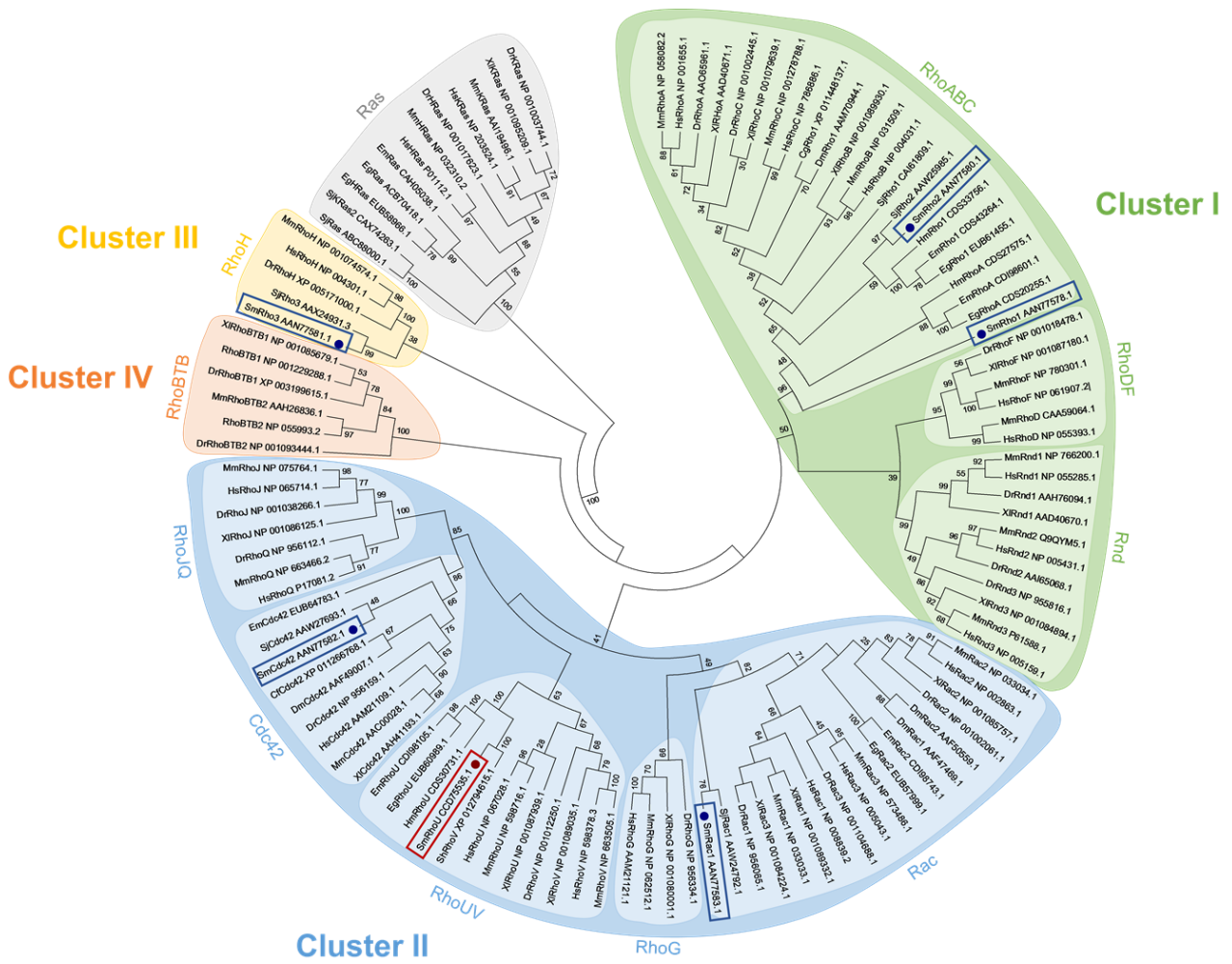


Figure S2: Phylogenetic analysis of Rho GTPase protein family.

A phylogenetic tree was generated using the maximum likelihood method under the JTT+G+I model with a bootstrap test (1000 replicates). The tree was generated using the alignment of proteins from RhoA/B/C, RhoD/F, Rnd, Rac, RhoG, RhoU/V, Cdc42, RHoJ/Q, RHoBTB and RhoH families using Ras family as outgroup. SmRhoU is boxed in red. SmRho1, SmRho2, SmRho3, SmCdc42 and SmRac1 are boxed in blue

Supplementary Table 1.

Structure, cytoskeleton arrangement	Protein synthesis
Prefoldin subunit, putative	CCD74872.1
Hypothetical protein Smp_196840 (<i>Collagen domain</i>)	CCD75837.1
Eggshell protein	P13396.2
Putative rho GTPase (= <i>SmrHou</i>)	CCD75535.1
Eggshell precursor protein	CAA29285.1
Putative thrombospondin, partial	CCD78747.1
Tropomyosin, partial	AAA03011.1
Chorion protein	AAA29862.1
Putative collagen alpha-1(V) chain precursor	CCD74829.1
Putative heat shock protein (<i>HSP90</i>)	CCD76275.1
egf-like domain protein (<i>Tenascin-X</i>)	CCD76330.1
Membrane trafficking	
t-complex-associate d-testis-expressed 1-related	CCD82914.1
Putative kinesin	CCD79109.1
Protein kinase (<i>TBC domain containing protein kinase-like protein</i>)	CCD81310.1
TBC1 domain family member 15, putative (<i>TBC1D15</i>)	CCD60088.1
Putative vacuolar protein sorting 26, vps26	CCD75413.1
Putative clathrin heavy chain	CCD75480.1
rab11, putative	CCD60258.1
Huntingtin interacting protein-related (<i>hip1</i>)	CCD78415.1
Beige/beach protein-related	CCD82382.1
Phosphoinositide 4-phosphate adaptor protein, putative (<i>FAPP</i>)	CCD60254.1
Putative rap9 and (<i>Rab7</i>)	CCD75823.1
GTP-binding protein-related = <i>Mitochondrial Rho GTPase 1 (MIRO1)</i>	CCD75566.1
Gene expression	
Putative prokaryotic DNA topoisomerase (<i>DNA topoisomerase 3-alpha</i>)	CCD80906.1
Match	CCD75203.1
Putative smu-1 suppressor of mec-8 and unc-52 homolog	CCD76970.1
Mxi neural development protein (<i>MAX-interacting protein</i>)	CCD78573.1
hypothetical protein Smp_123690 (<i>RNA-splicing endonuclease subunit Sen54, TSEN54</i>)	CCD80341.1
Putative replication factor A.1, rfa1	CCD78061.1
Putative cellular nucleic acid binding protein (<i>CNBP</i>)	CCD79657.1
Putative ikappab kinase complex-associated protein (<i>elongator complex protein 1</i>)	CCD79461.1
Hypothetical protein Smp_132830 (<i>HLH domain</i>)	CCD58489.1
Histone deacetylase 1 (<i>HDA C1</i>)	ABN81193.1
Putative cohesin subunit rad21	CCD81813.1
Putative suppressor of hairy wing homolog	CCD77057.1
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32-related protein (<i>ANP32/acidic nuclear phosphoprotein-like protein</i>)	CCD80956.1
Putative WD-repeat protein	
Unnamed protein product (<i>LSM14 protein homolog</i>)	CCD58382.1
Putative 60s ribosomal protein L3	CCD82117.1
Ribosomal protein related (<i>39S ribosomal protein L16, mitochondria</i>)	CCD75784.1
Putative eukaryotic translation elongation factor (<i>EF-2</i>)	CCD79147.1
Hypothetical protein Smp_175810 (<i>39S ribosomal protein L40, mitochondria</i>)	CCD60706.1
Hypothetical protein Smp_012340 (<i>U3 small nucleolar RNA-associated protein 14, Utp14</i>)	CCD77482.1
Ribosomal protein L15, putative	CCD60022.1
Diverse enzymes	
Cathepsin B endopeptidase	CAC85211.2
Glutathione S-transferase 28 kDa (<i>GST 28</i>)	P09792.1
Microsomal GST-3	CCD79728.1
Cathepsin B1 isotype 1	CAD44624.1
Thymidylate kinase	CAZ27839.1
Putative alpha-galactosidase/alpha-n-acetylgalactosaminidase	CCD80298.1
Putative o-methyltransferase	CCD79908.1
Tyrosinase 1 precursor	AAP93838.1
Putative cathepsin C	CCD78901.1
alpha 1,6 fucosyltransferase J (<i>FUT8</i>)	AEW22970.1
Cytochrome oxidase subunit 1 (<i>Cox1</i>)	CCD63151.1
26 kD glutathione-S-transferase, Sm26, putative	CCD69592.1
Putative pap-nositol-1,4-phosphatase	CCD75965.1
Cytochrome b	NP_066212.2
Hypothetical protein Smp_133840 (<i>Lipoxigenase homology domain-containing protein 1, LOXHD1</i>)	CCD81141.1
Scp1(yeast) protein kinase-like	CCD86256.1
Hypothetical protein Smp_058150.1 (<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 10, NDUFB10</i>)	CCD80054.1
Cathepsin L3 precursor	ABV71063.1
Serine/threonine kinase (<i>SNF1A/AMP-activated protein kinase</i>)	CCD81185.1
Hypothetical protein Smp_137720, partial (<i>Saposin B domain</i>)	CCD77215.1
Putative ring finger protein 14 (androgen receptor-associated protein 5A) (<i>riad2</i> , protein)	CCD78992.1
Elongation of fatty acids protein 1	CCD80936.1
Unknown functions	
Hypothetical protein Smp_073450 (<i>SVC domain</i>)	CCD82965.1
Hypothetical protein Smp_175270 (<i>DST domain</i>)	CAZ36806.1
Hypothetical protein Smp_126550 (<i>no conserved domain</i>)	CCD78088.1
Hypothetical protein Smp_152870 (<i>no conserved domain</i>)	CCD75554.1
Hypothetical protein Smp_020070 (<i>no conserved domain</i>)	CCD75103.1
Hypothetical protein Smp_099150 (<i>PH domain-containing family B member 2</i>)	CCD58716.1
Hypothetical protein Smp_166320 (<i>no conserved domain</i>)	CCD76509.1
Putative WD-repeat protein	CCD77134.1

Table S1: List of proteins identified by yeast-three-hybrid analysis using SmShb coupled to the intracellular domain of SmVkr1 as bait. Protein were classified in functional groups and Genbank accession numbers are indicated.

Supplementary Table 2.

Primer name	Sequence
Cl726Sh2protNt r	5'-GCCGCACCATCTGGTGGACATCTTGGT-3'
SmShbRaceNested5'r	5'-CGTAAAACAAAATGATCATCACCAATATCTGTTAGA-3'
Cl726Sh2protCt f	5'-GCTACCAGTACGTGGTACAACCTCCGGT-3'
SmShbRaceNested3'f	5'-CAGATAATACTATTGGATCTCATGGACC-3'
SH2protFL f	5'-CCTGATAACTCTTCCAATACAG-3'
SH2protFL r	5'-GTAAAAGTAATGGGGGAGAGGATCG-3'
SmShbFLRE f	5'-GGATCTCATGGACCTTTTGAATCGATATATGTCAACTCATACTC-3'
SmShbFLRE r	5'-GATTTATCTCGAGAAATGCAATACGACTGATTGGGAAGCGC-3'
SH2domain f	5'-GACATCAAAAATCAGAATTCTCACGTCATCATAGTAGTAGTAC-3'
SmVKR1REpBr-f	5'-GCGGCCGCACAATTAATAAATTCGTCAACCAT-3'
SmVKR1REpBr-r	5'-CCGGAGATCTTAAACTGTTATCTTGTGAACATTTTG-3'
SmShbdeISH2 f	5'-CAGCGATATCTTAACTTGAATACTCAACTATGGTTTCACCG-3'
SmShbdeISH2 r	5'-CGGTGAAACCATAGTTGATTTTCAAGTTGTTAAGATATCGCTG-3'
SmVKR1YYRE f	5'-CGAAGGTTATTATCGCGAGACTCGTAACTGTGAAC-3'
SmVKR1YYRE r	5'-GTTACAGTTACGAGTCTCGCGATAATAACCTTCG-3'
SmVKR1DK f	5'-GATGGGATTGTAATAAATGGGAGATaatgctTFACTCGT-3'
SmVKR1DK r	5'-CACGAGTAAGAGCATTATCTCCAATTTTACAATCCCATC-3'
SmVKR1Y979F f	5'-CGTCAACCATTTGAAAACCTTTGTAATGAGCTAAAAGACATT-3'
SmVKR1Y979F r	5'-AATGCTTTTTAGCTCATTACAAAGGTTTTCAAATGGTTGACG-3'
SmVKR2F949Y f	5'-CGAACACGTAACCTTATGAAGAAGTATGCACAG-3'
SmVKR2F949Y r	5'-CTGTGCATAGTTCTTCATAAGGTTTACGTGTTTCG-3'
SmShb-HIS1-f	5'-GATGGTGCAGGTCATGAAATCTCTCC-3'
SmShb-HIS1-r	5'-GGTGGAGGTGGGAACCAAGTATTTGTATCGG-3'
SmShb-HIS2-f	5'-CCGTCTTCCCCACCCCTCCACCATCA-3'
SmShb-HIS2-r	5'-CCCATGGAACAACAGATCTTCCATCGAGAGG-3'
SmShb RNAi T7 f	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAGCAACTTATCCTTCTGACAAG-3'
SmShb RNAi T7 r	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAGAGATTGAAACTCTGTGTGC-3'
LucT7 f	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAGACTGGAGACATAGCTTACTG-3'
LucT7 r	5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAGGATCTCTGATTTTCTTTCGCG-3'
SmShb qPCR f	5'-AGTCTTCTACACGATTCACCTT-3'
SmShb qPCR r	5'-TTAGTCGATTCTGAGGTTAGAT-3'
SmTubulin qPCR f	5'-AGCAGTTAAGCGTTGCAGAAATC-3'
SmTubulin qPCR r	5'-GACGAGGGTCACATTTCAACCAT-3'

Table S2: List of oligonucleotide sequences used as primers

B. Etude des partenaires de SmShb

Lors de l'interférence de SmShb chez le parasite adulte, nous avons observé une accumulation de spermatozoïdes matures au niveau des testicules des parasites et avons émis l'hypothèse que cela pourrait être dû à un défaut de migration des gamètes matures. Au vu de ces résultats et du rôle de SmShb dans la spécificité d'activation de la voie JNK par SmVKR1, nos études se sont focalisées sur deux protéines partenaires du complexe SmVKR1-SmShb identifiées lors du criblage de la banque d'ADNc de parasites adultes : SmTcTex-1 (Genbank n° CCD82914.1) et SmRhoU (Genbank n° : CCD75535.1).

- [SmTcTex-1](#)

La dynéine est un complexe protéique formé de chaînes lourdes associées à différentes chaînes intermédiaires, elles-mêmes liées à des chaînes légères. Ainsi formées, les dynéines sont des protéines motrices qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer vers l'extrémité (-) des microtubules et qui permettent donc le transport rétrograde (vers le centre de la cellule) des vésicules. Au niveau des axonèmes, les dynéines permettent de faire glisser les microtubules entre eux induisant ainsi le battement des cils ou des flagelles.

Les protéines TcTex (pour t-complex associated testis expressed 1) forment une famille de chaînes légères de dynéine. En se liant aux chaînes intermédiaires, elles font le lien entre le complexe de dynéine et le cargo. Depuis quelques années, des études ont montré que les chaînes légères de dynéine peuvent présenter des rôles indépendants de la dynéine. Par exemple, TcTex-1 joue un rôle dans la croissance des neurites en modulant la dynamique de l'actine et l'activité de Rac1, et cela indépendamment de son rôle associé à la dynéine (Chuang et al., 2005). TcTex-1 est également impliqué dans la résorption du cil et l'entrée en phase S (Li et al., 2011; Yeh et al., 2013). Plus récemment, il a été montré que TcTex-1 s'associe aux kinétochores et contribue à stabiliser leur association aux microtubules, toujours indépendamment de la dynéine (Liu et al., 2015). En parallèle, différentes études ont mis en évidence un rôle de TcTex-1 dans la fertilité : chez la souris, TcTex-1 est impliquée dans la différenciation des spermatozoïdes et aurait un rôle dans leur motilité (Korrodigregorio et al., 2013), chez *D. melanogaster*, TcTex-1 serait nécessaire pour la production de spermatozoïdes fonctionnels (Caggese et al., 2001).

L'alignement de SmTcTex-1 avec ses homologues nous a permis de mettre en évidence une forte conservation de la protéine ($\approx 70\%$ d'identité avec les TcTex-1 de mammifères). La séquence protéique de SmTcTex-1 contient la Thréonine conservée T₉₄ dont l'état de phosphorylation permet de réguler l'interaction de la protéine avec la chaîne intermédiaire de la dynéine (Chuang et al., 2005). La co-expression de SmShb et de SmTcTex-1 en ovocyte de xénope a permis de confirmer l'interaction

entre ces deux protéines [Figure 49A]. En parallèle, nous avons montré que cette interaction dépend de l'état de phosphorylation de SmTcTex-1. En effet, alors que la mutation de la T₉₄ par un résidu Alanine non phosphorylable (SmTcTex-1 T₉₄A) n'a aucun effet sur l'interaction avec SmShb, la mutation de la T₉₄ par un acide aminé mimant la phosphorylation (SmTcTex-1 T₉₄E) inhibe totalement cette interaction [Figure 49B].

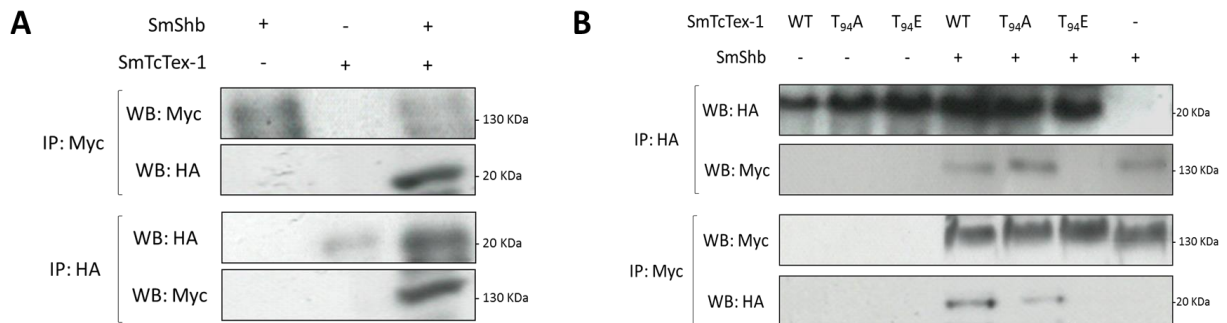


Figure 49 : SmShb interagit avec SmTcTex-1 non phosphorylée. Suite à leur co-expression en ovocyte de xénope, les protéines SmShb-Myc et SmTcTex-1-HA sont immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-HA ou anti-Myc. Chaque complexe immun est ensuite révélé par des anticorps anti-HA et anti-Myc. A. SmShb est co-immunoprécipité avec SmTcTex-1 et inversement. B. SmShb co-précipite avec SmTcTex T₉₄A mais pas avec SmTcTex T₉₄E.

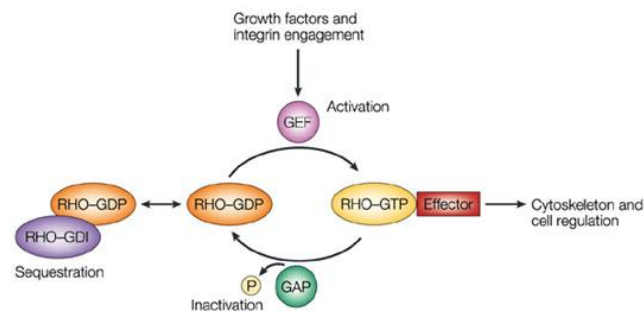
Les protéines TcTex-1 se lient aux chaînes intermédiaires de dynéine au niveau du motif hydrophobe R/K-R/K-X-X-R/K (Wu et al., 2005). De façon intéressante, l'analyse de la séquence de SmShb a mis en évidence la présence d'une séquence R₇₆₄R₇₆₅SCR₇₆₈. Afin de déterminer le rôle de cette séquence dans l'interaction SmShb-SmTcTex-1, nous avons produit un mutant de SmShb dans lequel les trois résidus Arginine ont été remplacés par des Alanines (SmShb AAXxA). Bien que les résultats obtenus nécessitent d'être confirmés, des expériences préliminaires de co-expression en ovocyte de xénope ont montré que le motif RRxxR de SmShb pourrait être impliqué dans son interaction avec SmTcTex-1.

- SmRhoU

Les GTPases Rho (Ras-homology protein) régulent des voies de signalisation impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la dynamique du cytosquelette, la régulation de la transcription, la progression du cycle ou la différenciation cellulaire. La plupart des études se sont focalisées sur les trois GTPases Rho « classiques » : RhoA, Rac1 et Cdc42. Ces Rho GTPases suivent un schéma commun d'activation et de régulation [Figure 50].

D'autres Rho GTPases ne suivent pas ce schéma d'activation mais sont plutôt régulées au niveau de leur expression et de leur dégradation ou encore par interaction protéine-protéine. Ces Rho GTPases sont dites « atypiques ». Les protéines RhoU (ou Wrch-1 pour Wnt-responsive Cdc42 homolog-1) et

RhoV (ou Chp pour Cdc42 homologous protein) forment une sous-famille appartenant à cette catégorie.



Nature Reviews | Cancer

Figure 50 : Modèle de régulation des Rho GTPases classiques (Sahai et Marshall, 2002). La Rho-GDP inactive interagit avec un GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui permet l'échange du GDP pour du GTP. La liaison du GTP est souvent associée à la translocation des protéines Rho à la membrane et induit un changement de conformation permettant l'interaction de la Rho-GTP avec ses effecteurs. L'hydrolyse du GTP est facilitée par l'intervention de GAP (GTPase Activating Proteins), qui agissent en tant que régulateurs négatifs de la signalisation des Rho. Une troisième catégorie de protéine, les GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors), se lie aux Rho GTPases prénylées et les séquestrent en conformation inactive dans le cytoplasme.

Alors que RhoU est ubiquitaire, l'expression de RhoV semble être plus limitée. Contrairement à d'autres Rho atypiques, les RhoU/V présentent un domaine GTPase classique mais sont majoritairement présentes sous forme active, liée au GTP. La plupart des Rho présente un motif C-terminal CAAX, permettant leur prénylation et donc leur ciblage à la membrane. RhoU et RhoV possèdent respectivement un motif CCFV et CFV permettant leur ciblage à la membrane par palmitoylation. RhoU et RhoV contiennent une extension N-terminale présentant plusieurs motifs riches en Proline PxxP. Il a été montré que RhoU est capable d'interagir par son extrémité N-terminale avec les domaines SH3 de différentes protéines adaptatrices telles que Grb2 ou Nck (Aspenström et al., 2007). D'ailleurs, des études ont mis en évidence que RhoU interagit avec l'EGFR par l'intermédiaire de Grb2 et est ainsi impliqué dans l'activation de la voie JNK et la migration cellulaire dépendante de la stimulation par l'EGF (Zhang et al., 2011). Différents travaux ont ainsi mis en évidence l'implication des protéines RhoU/V dans l'adhésion cellulaire, la dynamique du cytosquelette et dans l'activation de la voie JNK, notamment par l'intermédiaire de protéines PAKs (p21-Activated Kinases) (Bhavsar et al., 2013; Dart et al., 2015; Dickover et al., 2014; Ory et al., 2007; Shepelev et Korobko, 2012; Tao et al., 2001).

L'analyse phylogénétique de SmRhoU (Figure S2 de l'article) a permis de montrer son appartenance à la famille des RhoU/V (environ 30% d'identité avec HsRhoU et HsRhoV). De plus, alors que deux représentants de la famille RhoU/V sont exprimés chez les vertébrés, un seul membre a été

La co-expression de SmRhoU avec SmShb en ovocyte de xénope nous a permis de confirmer l'interaction entre les deux protéines. En effet, l'analyse par western blot des complexes immuns a mis en évidence une co-immunoprécipitation des deux protéines [Figure 52A]. En parallèle, nous avons souhaité vérifier le rôle des différents domaines de SmRhoU dans l'interaction avec SmShb. Pour cela, nous avons construit un mutant pour lequel nous avons supprimé l'extension N-terminale (SmRhoU^{ΔNt}) et un mutant pour lequel nous avons muté le site potentiel de palmitoylation (SmRhoU^{C334A}). La co-expression de ces différents mutants avec SmShb en ovocyte de xénope montre qu'une modification de SmRhoU interrompt son interaction avec SmShb [Figure 52B]. Ces résultats laissent supposer que l'interaction SmShb-SmRhoU serait dépendante de l'adressage à la membrane de la GTPase et qu'elle nécessiterait également l'extension N-terminale de SmRhoU.

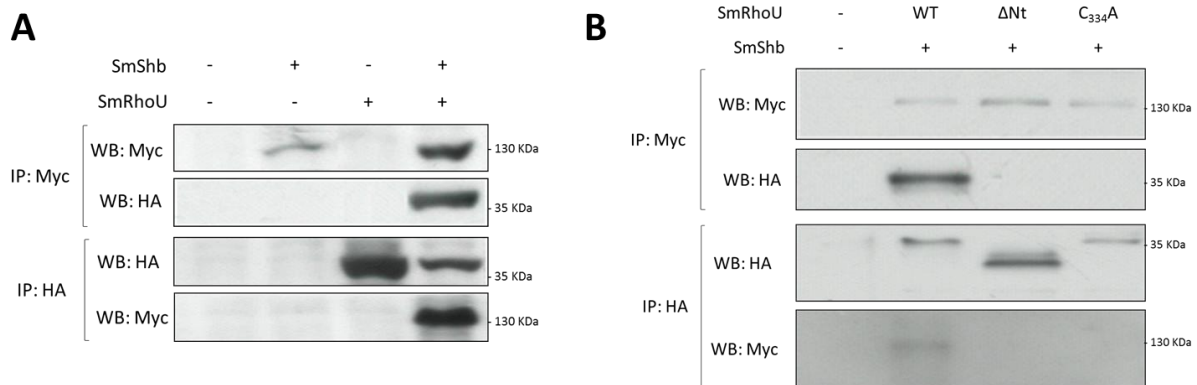


Figure 52 : SmShb interagit avec SmRhoU. Suite à leur co-expression en ovocyte de xénope, les protéines SmShb-Myc et SmRhoU-HA sont immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-HA ou anti-Myc. Chaque complexe immunitaire est ensuite révélé par des anticorps anti-HA et anti-Myc. A. SmShb est co-immunoprécipité avec SmRhoU et inversement. B. La délétion de l'extension N-terminale ou la mutation du site de palmitoylation de SmRhoU empêche son interaction avec SmShb.

Il serait également intéressant de vérifier si la liaison entre SmShb et SmRhoU dépend de son activité GTPasique. En nous basant sur la littérature (Saras et al., 2004), nous avons construit un mutant constitutivement actif SmRhoU^{K94L} ainsi qu'un mutant inactif SmRhoU^{T50N}. Des expériences préliminaires indiquent qu'aucun de ces deux mutants ne semble interagir avec SmShb. Cependant, comme cela pourrait être dû à une mauvaise conformation de la GTPase, ces expériences nécessitent de déterminer préalablement si la protéine sauvage et les mutants construits possèdent ou non l'activité catalytique attendue.

C. Rôle de JNK dans la reproduction de *S. mansoni*

Nous avons précédemment montré en ovocyte de xénope que l'interaction de SmShb avec SmVKR1 induisait spécifiquement la voie JNK au détriment des voies Akt et ERK.

Afin de déterminer la fonction de JNK dans la biologie du parasite, des couples de vers adultes ont été traités pendant 72 heures avec du SP600125, un inhibiteur spécifique de la phosphorylation de JNK. Ces expériences ont mis en évidence l'essentialité de l'activité de JNK pour la ponte du parasite. En effet, alors que le traitement des vers avec l'inhibiteur (25 μ M) n'a que peu d'effet sur leur appariement [Figure 53A], celui-ci entraîne une diminution très importante (> 90%) de leur ponte [Figure 53B]. L'observation au microscope confocal des parasites traités a mis en évidence une désorganisation de l'ovaire avec une augmentation du ratio ovocytes matures/ovocytes immatures [Figure 53C].

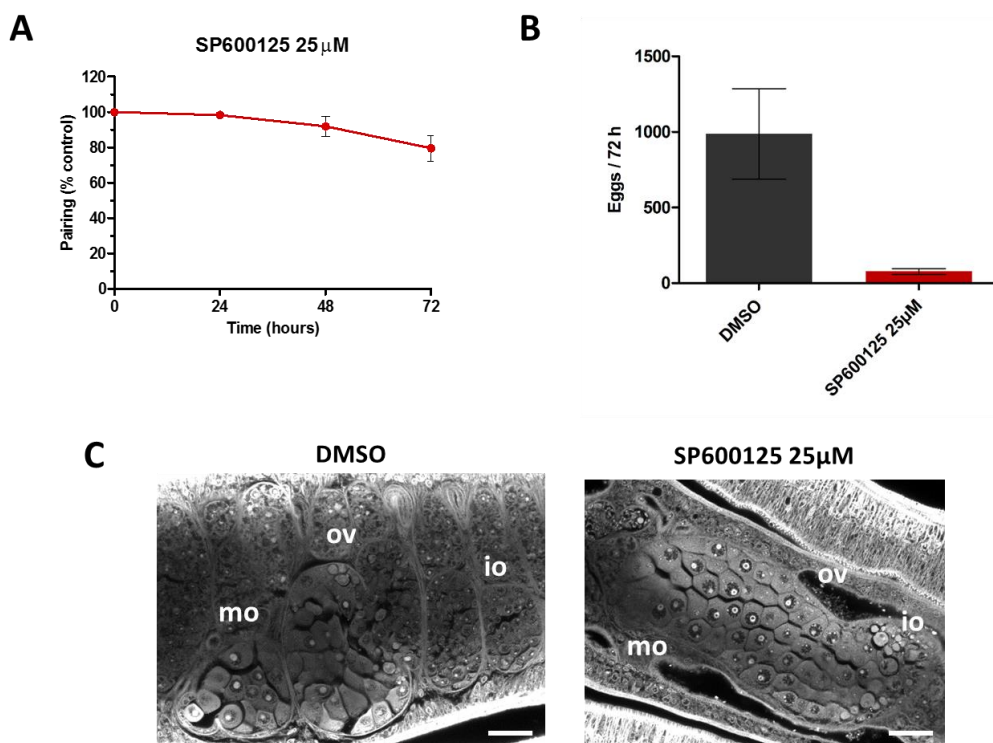


Figure 53 : Effet d'un inhibiteur de JNK sur l'appariement (A), la ponte (B) et la morphologie des ovaires de femelles adultes appariées (C). Des couples de vers adultes sont cultivés pendant 72 heures avec du DMSO ou 25 μ M de SP600125. A. Le pourcentage de vers appariés est déterminé toutes les 24 heures. Les résultats sont donnés en pourcentage de vers appariés par rapport au contrôle (Moyenne de 3 expériences indépendantes). B. Après 72 heures, le nombre total d'œufs pondus est déterminé dans chaque condition. C. La morphologie des vers est observée par microscopie confocale à balayage laser après coloration des vers au rouge carmin.

Suite à un stimulus (stress, cytokine, facteur de croissance,...), une MAP3K phosphoryle une MAP2K (MKK4 ou MKK7) qui active à son tour JNK. Une fois phosphorylée, JNK est transloquée au

noyau où elle va pouvoir activer ou inhiber différents facteurs de transcription, régulant ainsi divers processus cellulaires tels que l'apoptose, la différenciation, le métabolisme ou la migration des cellules. En parallèle, JNK peut également réguler la migration cellulaire en phosphorylant d'autres substrats non-nucléaires tels qu'une protéine d'adhésion focale, la Paxillin, ou les protéines associées aux microtubules (MAPs) (Bogoyevitch et Kobe, 2006).

Les résultats obtenus lors du traitement des parasites avec le SP600125 semblent indiquer un rôle essentiel de l'activation de JNK dans la reproduction du parasite. La diminution de la ponte pourrait être corrélée à un défaut de migration des ovocytes matures qui s'accumulent alors dans l'ovaire, prenant ainsi la place des ovocytes immatures.

Précédemment, il avait été montré que suite à l'interférence de schistosomules pour SmJNK puis leur injection chez la souris, peu de parasites adultes et d'œufs étaient retrouvés dans les tissus de l'hôte après 37 jours de développement. L'analyse par microscopie confocale des vers adultes récupérés avait mis en évidence un endommagement du tégument des mâles ainsi qu'une majorité d'ovocytes immatures dans l'ovaire des femelles (Andrade et al., 2014). Ces études sont basées sur une interférence réalisée au stade schistosomule. L'analyse de l'interférence au cours du temps par les auteurs a montré que bien que la quantité de transcrits codant pour SmJNK est diminuée de plus de 80 % les 4 premiers jours, elle ne l'est plus que de 50 % après 7 jours (Andrade et al., 2014). De ce fait, la diminution du nombre de vers adultes récupérés après 37 jours semble indiquer un rôle de SmJNK dans les premiers stades de développement des schistosomules. Ainsi, le phénotype observé chez les parasites ayant pu se développer jusqu'au stade adulte pourrait être dû à des défauts pendant le développement des schistosomules en vers adultes. En revanche, lors de l'inhibition de JNK par le SP600125, nous agissons sur les parasites déjà développés en vers adultes, ce qui peut expliquer la différence de phénotype observé dans ces deux contextes différents.

Le phénotype observé au niveau des ovaires des femelles traitées avec le SP600125 peut être mis en relation avec celui obtenu lors de l'interférence de SmVKR1 (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}). En effet, dans les deux cas, nous observons une augmentation du ratio ovocytes matures/ovocytes immatures. Nos études ont également montré que SmVKR1 était principalement localisé au niveau des ovocytes matures et était capable d'activer une voie JNK. L'analyse de ses partenaires mettait également en évidence la présence de protéines impliquées dans la voie JNK (telles que Mkk7 ou PP2C), ainsi que des protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette (RhoA) (Vanderstraete et al., 2014^{Annexe 2}).

Ensemble, ces résultats semblent indiquer un rôle de la voie SmVKR1-JNK dans la migration des ovocytes matures. Lors de l'analyse moléculaire de l'interaction SmVKR1-SmShb, nous avons montré

que le complexe est responsable de l'activation spécifique de la voie JNK. Cependant, du fait de l'absence de phénotype observé au niveau des ovaires lors de l'interférence de SmShb, le rôle de la protéine adaptatrice dans cette voie chez le parasite reste indéterminé.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En affectant plus de 240 millions de personnes vivant dans les zones tropicales et subtropicales, la schistosomiase est une parasitose d'envergure économique et sociale pour beaucoup de pays en développement. Le traitement des populations est à ce jour basé sur une seule molécule : le Praziquantel (PZQ). Ce traitement est efficace pour éliminer toutes les espèces majeures de schistosomes responsables de la pathologie mais présente quelques inconvénients : 1) la molécule n'est pas efficace contre les formes juvéniles des schistosomes ; 2) le traitement au PZQ ne prévient pas la ré-infestation par le parasite, nécessitant donc une administration régulière et massive du traitement dans les zones endémiques. Bien qu'aucune preuve concrète de résistance au PZQ n'ait été donnée aujourd'hui, certains isolats de schistosomes semblent développer une certaine tolérance au traitement. Afin de parer à l'apparition de « vraies » résistances, de nombreux efforts ont été déployés afin d'identifier les mécanismes essentiels au développement et à la reproduction du parasite dans le but de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

1. Les VKRs et leurs kinases associées sont-elles des cibles thérapeutiques prometteuses ?

Chez tous les organismes, les kinases constituent des régulateurs essentiels de processus cellulaires fondamentaux tels que la migration, la différenciation ou la prolifération. Dérégulées dans de nombreux cancers, les tyrosines kinases sont souvent ciblées pour lutter contre la pathologie (Gross et al., 2015).

Ces dernières années, différentes études ont mis en évidence l'essentialité des protéines kinases dans la biologie du schistosome. En effet, l'inhibition de plusieurs protéines kinases du parasite présente souvent un impact sur sa survie ou du moins sur sa reproduction (Dissous et Grevelding, 2011; Gelmedin et al., 2015). Dans ce contexte, les études menées au laboratoire sur les Récepteurs Tyrosine Kinases (RTKs) de *S. mansoni* ont conduit à l'identification d'une nouvelle famille de RTKs spécifiques des invertébrés : les récepteurs Venus Kinase (VKRs). Compte tenu de leur absence chez les vertébrés, les VKRs pourraient être des cibles thérapeutiques de choix pour lutter contre la schistosomiase.

Les études menées au laboratoire sur les VKRs de *S. mansoni* ont montré leur implication dans les mécanismes de reproduction du parasite. Ainsi, les VKRs semblent jouer un rôle important dans la reproduction des helminthes, mais également dans celle des insectes vecteurs de pathogènes. En effet, des études menées chez *Aedes aegypti*, ont aussi montré l'importance des VKRs dans la maturation des œufs (Dissous, 2015).

Chez le schistosome, l'activité kinase des VKRs peut être directement inhibée par différentes molécules ciblant le domaine kinase. C'est notamment le cas de la tyrphostine AG1024, un inhibiteur de tyrosine kinase, qui, en plus des VKRs, peut cibler simultanément d'autres RTKs de *S. mansoni*.

L'AG1024 entraîne une diminution de la ponte ainsi que des dégâts considérables sur la morphologie des organes reproducteurs, confirmant un rôle essentiel des RTKs dans la reproduction du parasite. L'AG1024 induit également la mort des schistosomules par apoptose (Vanderstraete *et al.*, 2013^{Annexe 4}).

Lors d'un criblage d'inhibiteurs de kinases, nous avons montré que les composants de la voie Akt peuvent aussi constituer des cibles thérapeutiques contre le schistosome. Tout comme l'AG1024, des inhibiteurs d'Akt entraînent une forte réduction de la reproduction des parasites adultes ainsi qu'une mort des schistosomules. En parallèle, nous avons mis en évidence qu'un inhibiteur de JNK provoque lui-aussi un arrêt de la production des œufs par le parasite. D'autres auteurs ont montré que l'inhibition de ERK entraîne également une diminution de la ponte des parasites (Ressurreição *et al.*, 2014). De plus, l'interférence de ERK et de JNK semble avoir un impact sur le développement des larves et entraîne une diminution du nombre d'œufs pondus (Andrade *et al.*, 2014).

Comme nous avons montré que les SmVKRs sont capables d'induire les voies ERK, Akt et JNK (Vanderstraete *et al.*, 2014^{Annexe 2}), l'ensemble de ces données indique que parallèlement à une inhibition directe de l'activité kinase des RTKs du parasite, il est possible d'envisager un contrôle en aval, au niveau de leurs partenaires de signalisation, pour atteindre le parasite. Une meilleure connaissance des mécanismes de transduction du signal par les VKRs permettrait de cibler plus spécifiquement ces RTKs atypiques, présents uniquement chez les invertébrés.

2. Les voies de signalisation et les partenaires de SmVKR1

La signalisation cellulaire englobe des mécanismes complexes régissant les principales fonctions des cellules. Celle-ci implique en général un signal extérieur qui, par le biais de cascades d'activation d'enzymes de modification et d'interactions protéine-protéine, conduit à une régulation fine de divers facteurs régulant l'expression des gènes de réponse à ce signal.

La signalisation « phosphotyrosine » met en jeu trois modules fonctionnels distincts : 1) la tyrosine kinase, qui phosphoryle une tyrosine spécifique, 2) la phosphotyrosine phosphatase, qui déphosphoryle cette tyrosine, 3) le domaine SH2, qui reconnaît la tyrosine phosphorylée. Ainsi, les protéines présentant un domaine SH2 jouent un rôle essentiel dans la signalisation des RTKs.

a. La protéine adaptatrice SmShb

Comme l'on pouvait s'y attendre, nous avons pu identifier, parmi les partenaires des VKRs de *S. mansoni*, une protéine à domaine SH2 présentant un intérêt pour l'étude des voies de signalisation induites par ces récepteurs. Ainsi la protéine SmShb s'est révélée être un partenaire de SmVKR1. Malgré la faible conservation de sa partie N-terminale, le domaine SH2 de ce partenaire est très

similaire à celui des protéines de la famille Shb. A notre connaissance, SmShb représente la première protéine homologue aux Shb de mammifères caractérisée chez un organisme invertébré.

Depuis leur découverte en 1994 par le groupe du Pr Welsh, les fonctions des Shb ont été uniquement étudiées chez les mammifères. Ces auteurs ont pu montrer que la famille des protéines Shb comprend 4 membres : Shb, Shf, Shd et She. Bien que l'analyse phylogénétique nous permette de confirmer que SmShb appartient bien à cette famille de protéines, son rapprochement à l'un ou l'autre des 4 membres reste difficile. En effet, le domaine SH2 de SmShb présente une identité d'environ 40% avec les domaines SH2 des protéines Shb, Shf et Shd de mammifères, et une identité plus faible avec celui de She (29%).

L'analyse transcriptionnelle de *SmShb* semble indiquer une expression ubiquitaire du gène, comme cela est observé pour le gène *Shb* humain (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=6461>). Cela suggère que SmShb peut présenter des fonctions pléiotropes au sein des différents tissus du parasite. Différentes études de Welsh et collaborateurs, ont mis en évidence l'interaction de Shb avec de nombreux partenaires, incluant plusieurs RTKs. Nos analyses ont pour le moment montré une interaction spécifique de SmShb avec SmVKR1. Cependant, il n'est pas exclu que SmShb puisse interagir avec d'autres RTKs du parasite. D'ailleurs, l'interaction de Shb avec FGFR1 et le récepteur à l'Ephrine EphB2 ayant été démontrée chez les mammifères, il serait intéressant de déterminer s'il y a interaction entre SmShb et les différents homologues de ces RTKs présents chez *S. mansoni*. Si elles existaient, ces interactions confirmeraient la possibilité de rôles variés de SmShb au cours du cycle parasitaire.

De façon intéressante, une autre protéine possédant la même architecture que SmShb a été détectée chez *S. mansoni* (Genbank CCD58862.1, Smp_140360). Celle-ci présente une identité globale de seulement 16% avec SmShb mais les domaines SH2 de ces deux protéines sont identiques à 60% et présentent un profil d'identité similaire vis à vis des membres de la famille Shb. L'interaction de cette nouvelle protéine avec les différents RTKs du parasite mériterait d'être analysée, et notamment sa liaison possible à SmVKR1. En effet, compte tenu de leur divergence de séquence, SmShb et ce nouvel homologue pourraient lier des partenaires différents en aval du RTK et orienter différemment l'activation de voies de signalisation.

b. Rôle de SmShb dans la signalisation de SmVKR1

Nous avons montré que SmShb interagit spécifiquement, *via* son domaine SH2, avec une tyrosine phosphorylée en position juxtamembranaire (pY979) de SmVKR1. Cette interaction permet la phosphorylation de SmShb et l'activation spécifique d'une voie JNK dans l'ovocyte de xénope.

Cette voie JNK, initiée par la liaison de SmShb à SmVKR1, semble être différente de la voie JNK activée par SmVKR1 seul et ce pour deux raisons : 1) Le mutant SmVKR1 Y979F, qui ne peut plus lier SmShb, active toujours une voie JNK que l'on pourrait qualifier d' « endogène » dans l'ovocyte, et qui n'est pas dépendante de pY979 ; 2) Dans l'ovocyte, SmVKR2 n'active pas la voie JNK. SmVKR2 F949Y, rendu capable de lier SmShb, n'active la voie JNK qu'en présence de SmShb. Ensemble, ces données laissent penser que la voie JNK endogène induite par SmVKR1 seul est due à la capacité propre de SmVKR1 à lier des protéines du xénope et à activer une voie JNK indépendamment de son site de liaison à SmShb.

L'activation de la voie JNK dépendante de l'interaction SmVKR1-SmShb, se fait au détriment des voies Akt et ERK. En effet, les voies Akt et ERK activées par SmVKR1 sont inhibées lors de la fixation de SmShb. Une hypothèse serait liée à la taille de la protéine SmShb, qui est une protéine volumineuse de 130 kDa interagissant avec le domaine intracellulaire de SmVKR1 d'environ 70 kDa. De par sa taille, SmShb pourrait masquer sur SmVKR1 les sites de liaison des partenaires responsables de l'activation des voies ERK et Akt. Cependant, cette théorie ne semble pas être envisageable car nous avons montré que la liaison du domaine SH2 seul (≈ 15 kDa) entraîne l'inhibition des voies Akt et ERK, de la même façon que la protéine SmShb entière. Une autre hypothèse serait que l'occupation du site pY979 juxtamembranaire puisse avoir un impact sur la conformation de la partie intracellulaire de SmVKR1, empêchant la transduction du signal vers les voies Akt et ERK.

Il est à noter que chez la souris, bien qu'aucune implication de Shb dans la voie JNK n'ait été démontrée pour le moment, la déficience en Shb entraîne une exacerbation des voies ERK et Akt (Welsh et al., 2016). Ensemble, ces données suggèrent que SmShb pourrait moduler négativement les voies de prolifération ERK et Akt en induisant une voie JNK de différenciation.

La démonstration du rôle de SmVKR1 dans l'activation de la voie JNK est en accord avec les résultats précédents de criblage de la banque d'ADNc en levure. Des protéines identifiées comme partenaires potentiels de SmVKR1 sont susceptibles d'être impliquées dans la voie JNK (Vanderstraete et al., 2014 ^{Annexe 2}). Parmi celles-ci, MEK7 est une des MAPKK responsable de l'activation de JNK, PP2C est une phosphatase potentiellement impliquée dans la régulation négative de JNK (Baril et al., 2009), et la GTPase SmRho1 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette (Quack et al., 2009).

Lors de la recherche de partenaires du complexe SmVKR1-SmShb, nous avons identifié en plus SmRhoU, une Rho GTPase atypique dont l'homologue humain est capable d'interagir avec l'EGFR par l'intermédiaire de Grb2, ce qui conduit à l'activation de la voie JNK (Zhang et al., 2011). L'interaction entre SmShb et SmRhoU a été confirmée et nous avons pu montrer que celle-ci est indépendante de la liaison à SmVKR1. Il serait donc intéressant de vérifier si la formation d'un complexe SmVKR1-SmShb-SmRhoU est possible et si celui-ci induit toujours la voie JNK.

Les transcrits de SmShb et SmVKR1 ont été localisés chez le schistosome adulte surtout au niveau des ovocytes matures et dans les testicules. Cependant, nous n'avons pas observé de corrélation entre les phénotypes obtenus après leur interférence respective. En effet, alors que l'interférence de SmVKR1 produit chez la femelle une forte désorganisation de l'ovaire avec une majorité d'ovocytes matures (Vanderstraete *et al.*, 2014^{Annexe 2}), l'interférence de SmShb conduit plutôt à une accumulation de spermatozoïdes matures dans les testicules des mâles. Ces résultats s'expliquent sûrement par le fait que SmVKR1 et SmShb sont des protéines ubiquitaires avec des fonctions diverses dans les différents tissus, et qui peuvent interagir entre elles mais également avec de nombreux autres partenaires, comme cela a été montré lors des criblages de banque d'ADNc en levure.

c. Importance de l'interaction SmVKR1-SmShb dans le contrôle du développement larvaire

L'analyse des transcrits de SmVKR1 et SmShb au cours du cycle parasitaire a mis en évidence une plus forte expression des deux partenaires dans les stades larvaires de *S. mansoni* suggérant que les deux protéines pourraient jouer un rôle dans le développement du parasite.

- Chez le sporocyste :

L'interférence de SmVKR1 et/ou SmVKR2 chez le jeune sporocyste primaire (le stade larvaire se développant par reproduction asexuée au sein du mollusque) conduit à un retard de croissance des larves maintenues en culture *in vitro* pendant 7 jours (Gouignard, 2011). En 1995, Yoshino et Laursen ont montré que la co-culture de sporocystes primaires de *S. mansoni* avec des cellules Bge (cellules embryonnaires de *B. glabrata*) pendant 25 à 30 jours permettait la multiplication des larves et l'obtention *in vitro* de sporocystes secondaires. Il serait intéressant de mesurer l'impact de l'interférence des SmVKRs, mais également de SmShb, sur la croissance et le développement des sporocystes dans ces conditions de co-culture.

D'autre part, les premières études de SmVKR1 avaient mis en évidence la présence des transcrits dans les cellules bordant la masse neurale chez le miracidium et le sporocyste nouvellement transformé indiquant ainsi une localisation préférentielle au niveau des cellules germinales (Vicogne *et al.*, 2003). De ce fait, il pourrait être également intéressant de déterminer le rôle du couple SmVKR1-SmShb dans le maintien et la prolifération des cellules germinales. Pour cela, le protocole établi par Wang *et al* pourrait être mis en place. Celui-ci consiste à réaliser l'interférence sur des œufs fraîchement purifiés de foies de rongeurs infectés. Les œufs sont cultivés en présence d'ARN double brin pendant 8 jours. L'interférence est poursuivie après l'éclosion des miracidia puis pendant leur transformation en sporocystes. 20 à 40 heures après la transformation, un pulse d'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) de 24 heures est réalisé afin de marquer les cellules en prolifération. Après fixation des sporocystes

interférés, un double marquage EdU et POPO-1 (marquage des ARNs qui permet la détection des cellules germinales) est réalisé afin de déterminer le nombre de cellules germinales en prolifération (Wang et al., 2013).

- Chez le schistosomule :

Il serait également pertinent de déterminer le rôle des SmVKRs et de SmShb dans le développement du schistosomule, au cours de son développement en ver adulte au sein de l'hôte vertébré. L'injection de schistosomules préalablement incubés en présence d'ARN double brin chez la souris permettrait de mesurer au bout de 37 jours leur devenir chez l'hôte en comparaison de schistosomules non traités. Le nombre de vers adultes et d'œufs présents dans les tissus renseignerait sur une possible incapacité des schistosomules interférés par rapport aux contrôles à se développer chez l'hôte. L'examen en microscopie confocale des vers adultes récupérés pourrait permettre d'observer un phénotype résultant de l'interférence. L'application de ce protocole à l'étude des SmVKRs et de SmShb pourrait ainsi nous permettre de définir un rôle de ces protéines dans le développement et/ou la différenciation du schistosomule en ver adulte.

3. Recherche de nouveaux ligands des VKRs

Généralement, les récepteurs possédant un domaine extracellulaire de type VFT sont activés par de petits ligands tels que des ions, des acides aminés, des oses, des phéromones ou encore des petits peptides. Ces ligands peuvent se fixer dans la poche du VFT permettant sa fermeture et entraînant l'activation des récepteurs (Pin et al., 2003). Les études menées au laboratoire ont permis de montrer que SmVKR1 est activé par la liaison de la L-Arginine de la même façon que les VKRs d'insectes comme celui de l'abeille AmVKR et celui de l'Anophèle AgVKR. SmVKR2, quant à lui, est activable par les ions Ca^{++} . De plus, la nécessité de ces ligands pour la dimérisation et la phosphorylation des SmVKRs a été démontrée dans le modèle de l'ovocyte de xénope (Vanderstraete *et al.*, 2014^{Annexe 2}).

En 2015, Vogel *et al* ont montré que la neuroparsine d'*Aedes aegypti*, appelée OEH (Ovary Ecdysteroidogenic Hormone), est capable de se lier aux dimères d'AaeVKR de l'insecte et de permettre leur activation (Vogel et al., 2015). Les neuroparsines forment une famille de neuropeptides retrouvée chez la plupart des arthropodes. Cependant, ce neuropeptide n'est pas présent chez certaines espèces comme *D. melanogaster*. Il est intéressant de noter qu'aucun récepteur VKR n'a été détecté chez *D. melanogaster* (Vanderstraete et al., 2013a^{Annexe 1}) et les résultats obtenus pour AaeVKR encouragent à penser que les VKRs puissent être des récepteurs des neuroparsines chez les arthropodes (Dissous, 2015).

Ces informations indiquent aussi que les VKRs pourraient être capables de lier des peptides en plus des

acides aminés et des ions. Dans le cas de l'ANFR (Atrial Natriuretic Factor Receptor), qui possède un domaine de liaison au ligand de type VFT, il a été montré que le peptide ANF permettait de stabiliser la dimérisation des domaines VFT, eux-mêmes fermés par la fixation d'ions Cl⁻ (van den Akker, 2001). Ainsi, on pourrait imaginer un mode d'activation similaire pour les VKRs : en condition normale d'expression, la fixation de la L-Arginine pourrait permettre la fermeture du VFT, mais un peptide serait nécessaire à la stabilisation du dimère (Dissous, 2015). En ovocyte de xénope, on pourrait expliquer l'activation du VKR uniquement par la L-Arginine, par l'abondance des molécules exprimées à la membrane qui est liée aux conditions de surexpression des récepteurs dans ce modèle.

Chez le schistosome, la maturation des organes reproducteurs de la femelle est dépendante de son accouplement avec le mâle. Les facteurs responsables de l'activation de la vitellogenèse et de la gamétogénèse ne sont toujours pas connus à ce jour, mais on sait qu'un contact permanent entre les deux parasites est nécessaire à la maturation des organes reproducteurs femelles. Ainsi, la femelle est constamment logée au sein du canal gynécophore du ver mâle. Des expériences au laboratoire ont montré qu'un extrait du contenu du canal gynécophore du ver mâle chez des vers appariés, contient un ligand capable d'activer SmVKR1 exprimé en ovocyte de xénope mais celui-ci n'a pas été caractérisé (Gouignard, 2011). Si un ligand peptidique, similaire aux neuroparsines des insectes, est responsable de l'activation de SmVKR1, il pourrait être purifié par des analyses protéomiques et identifié par spectrométrie de masse.

En 1991, une hormone peptidique, la schistosomine, a été découverte chez le mollusque *Lymnaea stagnalis*, hôte intermédiaire du schistosome aviaire *Trichobilharzia ocellata* (Hordijk et al., 1991). Il a été montré que l'infestation de *L. stagnalis* par le schistosome stimule la sécrétion de schistosomine par le système nerveux central du mollusque, provoquant ainsi la castration partielle ou totale de *L. stagnalis* ainsi qu'une expansion de la glande digestive du mollusque, site de multiplication des sporocystes secondaires et de leur différenciation en cercaires. Cette hormone est également exprimée par *B. glabrata*, l'hôte intermédiaire de *S. mansoni*. Même si le rôle de la schistosomine sur la castration induite par le parasite n'a été mis en évidence chez *B. glabrata* (Zhang et al., 2009), la structure de cette hormone et son rôle possible dans la reproduction du mollusque, nous a amené à envisager l'étude de sa capacité ou non à induire la phosphorylation à la fois du VKR de *B. glabrata*, BgVKR, mais également des SmVKRs. La protéine recombinante BgSchistosomine a ainsi été produite et les études de son interaction avec les différents VKRs exprimés en ovocyte de xénope sont actuellement en cours.

4. Extension possible de l'étude fonctionnelle des VKRs à d'autres modèles invertébrés

Avec le relargage constant de nouvelles données génomiques et transcriptomiques, des gènes codant pour des récepteurs de type VKR sont régulièrement identifiés chez diverses espèces. L'étude des VKRs chez certains de ces organismes, pour lesquels des outils moléculaires performants sont disponibles pourrait élargir nos connaissances sur les VKRs. Parmi les espèces intéressantes se trouvent deux plathelminthes non parasitaires : les turbellariés *Schmidtea mediterranea* et *Macrostomum lignano*.

S. mediterranea est une planaire étudiée depuis longtemps pour ses extraordinaires capacités de régénération. De nombreuses stratégies d'études ont été mises en place permettant l'identification de mécanismes moléculaires impliqués dans la régénération. De nombreux marqueurs cellulaires ont été établis afin de définir précisément les phénotypes observés suite à une interférence. L'analyse du génome de *S. mediterranea* a mis en évidence 3 gènes codants pour des VKRs. Une collaboration a ainsi été établie avec le Dr Cebrià (Université de Barcelone) et les premiers résultats obtenus indiquent que l'interférence des VKRs présente un impact certain sur les mécanismes de régénération de la planaire (communication personnelle).

M. lignano est quant à lui un modèle d'étude beaucoup plus récent. Si ses capacités de régénération sont moindres que celles de *S. mediterranea*, sa reproduction est exclusivement sexuée et ses conditions simples de culture en laboratoire, sa petite taille et son temps de génération court (18 jours) permettent aujourd'hui l'établissement de lignées transgéniques.

L'analyse du transcriptome de *M. lignano* a permis l'identification de 4 transcrits différents codants pour des VKRs. Ainsi, l'analyse des VKRs dans ce modèle pourrait permettre d'étudier leur rôle dans la régénération, mais surtout dans la reproduction et le développement embryonnaire.

En parallèle, l'étude des VKRs chez les différents modèles arthropodes tels que les moustiques *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* chez lesquels des études ont déjà été amorcées, ou chez le crustacé *Parhyale hawaiensis*, dont la publication récente du génome a permis d'identifier deux gènes *vk*r, pourraient également apporter de nouvelles données sur ces récepteurs atypiques.

Ainsi, l'utilisation des différents modèles, aussi bien plathelminthes libres ou parasites qu'arthropodes, apporterait une meilleure connaissance des modes d'action des VKRs et une meilleure compréhension de leur place au niveau évolutif et de leur intérêt chez certaines espèces.

Parallèlement, ces études pourraient servir la lutte contre la schistosomiase mais aussi contre d'autres pathologies causées par des organismes invertébrés. En effet, du fait de leur présence chez de nombreuses espèces, toutes invertébrées, le ciblage des VKRs par des molécules spécifiques pourrait permettre de détruire d'autres parasites (les échinocoques, les douves, les ténias...) mais

également différents vecteurs tels que les moustiques du genre *Anopheles*, *Aedes* et *Culex* qui transmettent de nombreux pathogènes (Vanderstraete *et al.*, 2013a^{Annexe 1}).

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Ahier, A., Khayath, N., Vicogne, J., et Dissous, C. (2008). Insulin receptors and glucose uptake in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite* 15, 573-9.
- Ahier, A., Rondard, P., Gouignard, N., Khayath, N., Huang, S., Trolet, J., 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, e5651. doi:10.1371/journal.pone.0005651.
- Ahmad, G., Zhang, W., Torben, W., Ahrorov, A., Damian, R. T., Wolf, R. F., et al. (2011). Preclinical prophylactic efficacy testing of Sm-p80-based vaccine in a nonhuman primate model of *Schistosoma mansoni* infection and immunoglobulin G and E responses to Sm-p80 in human serum samples from an area where schistosomiasis is endemic. *J. Infect. Dis.* 204, 1437-49. doi:10.1093/infdis/jir545.
- Akerblom, B., Barg, S., Calounova, G., Mokhtari, D., Jansson, L., et Welsh, M. (2009). Impaired glucose homeostasis in Shb-/- mice. *J. Endocrinol.* 203, 271-9. doi:10.1677/JOE-09-0198.
- van den Akker, F. (2001). Detailed analysis of the atrial natriuretic factor receptor hormone-binding domain crystal structure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79, 692-704.
- Andrade, L. F. de, Mourão, M. de M., Geraldo, J. A., Coelho, F. S., Silva, L. L., Neves, R. H., et al. (2014). Regulation of *Schistosoma mansoni* development and reproduction by the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2949. doi:10.1371/journal.pntd.0002949.
- Andrade, L. F., Nahum, L. A., Avelar, L. G. A., Silva, L. L., Zerlotini, A., Ruiz, J. C., et al. (2011). Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics* 12, 215. doi:10.1186/1471-2164-12-215.
- Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R., et Seubert, J. (1983). Praziquantel. *Med. Res. Rev.* 3, 147-200.
- Annerén, C., Lindholm, C. K., Kriz, V., et Welsh, M. (2003). The FRK/RAK-SHB signaling cascade: a versatile signal-transduction pathway that regulates cell survival, differentiation and proliferation. *Curr. Mol. Med.* 3, 313-24.
- Aspenström, P., Ruusala, A., et Pacholsky, D. (2007). Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* 313, 3673-9. doi:10.1016/j.yexcr.2007.07.022.

-B-

- Bahia, D., Avelar, L., Mortara, R. A., Khayath, N., Yan, Y., Noël, C., et al. (2006). SmPKC1, a new protein kinase C identified in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1138-48. doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.025.
- Bahia, D., Mortara, R. A., Kusel, J. R., Andrade, L. F., Ludolf, F., Kuser, P. R., et al. (2007). *Schistosoma mansoni*: expression of Fes-like tyrosine kinase SmFes in the tegument and terebratorium suggests its involvement in host penetration. *Exp. Parasitol.* 116, 225 - 32. doi:10.1016/j.exppara.2007.01.009.
- Baker, D. A., et Deng, W. (2005). Cyclic GMP-dependent protein kinases in protozoa. *Front. Biosci.* 10, 1229-38.
- Balloul, J. M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., et al. (1987). Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature* 326, 149 - 53. doi:10.1038/326149a0.

- Baril, C., Sahmi, M., Ashton-Beaucage, D., Stronach, B., et Therrien, M. (2009). The PP2C Alphabet is a negative regulator of stress-activated protein kinase signaling in *Drosophila*. *Genetics* 181, 567-79. doi:10.1534/genetics.108.096461.
- Beall, M. J., McGonigle, S., et Pearce, E. J. (2000). Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF-beta signaling. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 131-42.
- Beall, M. J., et Pearce, E. J. (2001). Human transforming growth factor-beta activates a receptor serine/threonine kinase from the intravascular parasite *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 276, 31613-9. doi:10.1074/jbc.M104685200.
- Beckmann, S., Buro, C., Dissous, C., Hirzmann, J., et Grevelding, C. G. (2010a). The Syk kinase SmTK4 of *Schistosoma mansoni* is involved in the regulation of spermatogenesis and oogenesis. *PLoS Pathog.* 6, e1000769. doi:10.1371/journal.ppat.1000769.
- Beckmann, S., et Grevelding, C. G. (2010). Imatinib has a fatal impact on morphology, pairing stability and survival of adult *Schistosoma mansoni* in vitro. *Int. J. Parasitol.* 40, 521 - 6. doi:10.1016/j.ijpara.2010.01.007.
- Beckmann, S., Hahnel, S., Cailliau, K., Vanderstraete, M., Browaeys, E., Dissous, C., et al. (2011). Characterization of the Src/Abl hybrid kinase SmTK6 of *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 286, 42325-36. doi:10.1074/jbc.M110.210336.
- Beckmann, S., Quack, T., Burmeister, C., Buro, C., Long, T., Dissous, C., et al. (2010b). *Schistosoma mansoni*: signal transduction processes during the development of the reproductive organs. *Parasitology* 137, 497-520. doi:10.1017/S0031182010000053.
- Bhavsar, P. J., Infante, E., Khwaja, A., et Ridley, A. J. (2013). Analysis of Rho GTPase expression in T-ALL identifies RhoU as a target for Notch involved in T-ALL cell migration. *Oncogene* 32, 198-208. doi:10.1038/onc.2012.42.
- Biolchini, C. de L., Neves, R. H., Hulstijn, M., Gomes, D. C., et Machado-Silva, J. R. (2006). Development of *Schistosoma mansoni* worms in mice analyzed by bright field and confocal microscopy. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* 101 Suppl , 261-5.
- Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yajnik, V., et Margolis, B. (1994). A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 32031-4.
- Blair, K. L., Bennett, J. L., et Pax, R. A. (1988). *Schistosoma mansoni*: evidence for protein kinase-C-like modulation of muscle activity. *Exp. Parasitol.* 66, 243-52.
- Blume-Jensen, P., et Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355 - 65. doi:10.1038/35077225.
- Bogoyevitch, M. A., et Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 1061-95. doi:10.1128/MMBR.00025-06.
- Boulanger, D., Warter, A., Sellin, B., Lindner, V., Pierce, R. J., Chippaux, J. P., et al. (1999). Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge. *Vaccine* 17, 319-26.
- Brindley, P. J., et Sher, A. (1987). The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* 139, 215-20.
- Buro, C., Beckmann, S., Oliveira, K. C., Dissous, C., Cailliau, K., Marhöfer, R. J., et al. (2014). Imatinib treatment causes substantial transcriptional changes in adult *Schistosoma mansoni* in vitro exhibiting pleiotropic effects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2923. doi:10.1371/journal.pntd.0002923.

Buro, C., Oliveira, K. C., Lu, Z., Leutner, S., Beckmann, S., Dissous, C., et al. (2013). Transcriptome analyses of inhibitor-treated schistosome females provide evidence for cooperating Src-kinase and TGF β receptor pathways controlling mitosis and eggshell formation. *PLoS Pathog.* 9, e1003448. doi:10.1371/journal.ppat.1003448.

-C-

Caggese, C., Moschetti, R., Ragone, G., Barsanti, P., et Caizzi, R. (2001). dtctex-1, the *Drosophila melanogaster* homolog of a putative murine t-complex distorter encoding a dynein light chain, is required for production of functional sperm. *Mol. Genet. Genomics* 265, 436-44.

Calounova, G., Livera, G., Zhang, X.-Q., Liu, K., Gosden, R. G., et Welsh, M. (2010). The Src homology 2 domain-containing adapter protein B (SHB) regulates mouse oocyte maturation. *PLoS One* 5, e11155. doi:10.1371/journal.pone.0011155.

Chinkers, M., et Cohen, S. (1981). Purified EGF receptor-kinase interacts specifically with antibodies to Rous sarcoma virus transforming protein. *Nature* 290, 516-9.

Chuang, J.-Z., Yeh, T.-Y., Bollati, F., Conde, C., Canavosio, F., Caceres, A., et al. (2005). The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Dev. Cell* 9, 75-86. doi:10.1016/j.devcel.2005.04.003.

Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE* 2004, RE13. doi:10.1126/stke.2502004re13.

Collins, J. J., King, R. S., Cogswell, A., Williams, D. L., et Newmark, P. A. (2011). An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1009. doi:10.1371/journal.pntd.0001009.

Collins, J. J., Wang, B., Lambrus, B. G., Tharp, M. E., Iyer, H., et Newmark, P. A. (2013). Adult somatic stem cells in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature* 494, 476 - 9. doi:10.1038/nature11924.

Cori, G., et Cori, C. (1936). The formation of hexosephosphate esters in frog muscle. 116, 119-128.

Cori, G., et Green, A. (1943). Crystalline muscle phosphorylase II. 1. Prosthetic group. *J. Biol. Chem.* 151, 31-38.

Crabtree, J. E., et Wilson, R. A. (1980). *Schistosoma mansoni*: a scanning electron microscope study of the developing schistosomulum. *Parasitology* 81, 553-64.

Cross, M. J., Lu, L., Magnusson, P., Nyqvist, D., Holmqvist, K., Welsh, M., et al. (2002). 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* 13, 2881-93. doi:10.1091/mbc.E02-02-0103.

Cuadrado, A., et Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 429, 403-17. doi:10.1042/BJ20100323.

-D-

Dart, A. E., Box, G. M., Court, W., Gale, M. E., Brown, J. P., Pinder, S. E., et al. (2015). PAK4 promotes kinase-independent stabilization of RhoU to modulate cell adhesion. *J. Cell Biol.* 211, 863-79. doi:10.1083/jcb.201501072.

Das, R., Esposito, V., Abu-Abed, M., Anand, G. S., Taylor, S. S., et Melacini, G. (2007). cAMP activation of PKA defines an ancient signaling mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 93-8. doi:10.1073/pnas.0609033103.

- Davies, S. J., Shoemaker, C. B., et Pearce, E. J. (1998). A divergent member of the transforming growth factor beta receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 11234-40.
- Dempsey, E. C., Newton, A. C., Mochly-Rosen, D., Fields, A. P., Reyland, M. E., Insel, P. A., et al. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L429-38.
- Dewalick, S., Bexkens, M. L., van Balkom, B. W. M., Wu, Y.-P., Smit, C. H., Hokke, C. H., et al. (2011). The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton. *Int. J. Parasitol.* 41, 523-32. doi:10.1016/j.ijpara.2010.12.005.
- deWalick, S., Tielens, A. G. M., et van Hellemond, J. J. (2012). *Schistosoma mansoni*: the egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. *Exp. Parasitol.* 132, 7 - 13. doi:10.1016/j.exppara.2011.07.018.
- Dickover, M., Hegarty, J. M., Ly, K., Lopez, D., Yang, H., Zhang, R., et al. (2014). The atypical Rho GTPase, RhoU, regulates cell-adhesion molecules during cardiac morphogenesis. *Dev. Biol.* 389, 182-91. doi:10.1016/j.ydbio.2014.02.014.
- Dissous, C. (2015). Venus Kinase Receptors at the Crossroads of Insulin Signaling: Their Role in Reproduction for Helminths and Insects. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6, 118. doi:10.3389/fendo.2015.00118.
- Dissous, C., Ahier, A., et Khayath, N. (2007). Protein tyrosine kinases as new potential targets against human schistosomiasis. *Bioessays* 29, 1281-8. doi:10.1002/bies.20662.
- Dissous, C., et Grevelding, C. G. (2011). Piggy-backing the concept of cancer drugs for schistosomiasis treatment: a tangible perspective? *Trends Parasitol.* 27, 59-66. doi:10.1016/j.pt.2010.09.001.
- Dissous, C., Morel, M., et Vanderstraete, M. (2014). Venus kinase receptors: prospects in signaling and biological functions of these invertebrate kinases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 72. doi:10.3389/fendo.2014.00072.
- Doenhoff, M. J., Sabah, A. A., Fletcher, C., Webbe, G., et Bain, J. (1987). Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 947-51.
- Dorsey, C. H., Cousin, C. E., Lewis, F. A., et Stirewalt, M. A. (2002). Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. *Micron* 33, 279-323. doi:10.1016/S0968-4328(01)00019-1.
- Drubin, D. G., Mulholland, J., Zhu, Z. M., et Botstein, D. (1990). Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature* 343, 288 - 90. doi:10.1038/343288a0.
- Du, Y., Böck, B. C., Schachter, K. A., Chao, M., et Gallo, K. A. (2005). Cdc42 induces activation loop phosphorylation and membrane targeting of mixed lineage kinase 3. *J. Biol. Chem.* 280, 42984-93. doi:10.1074/jbc.M502671200.

-E-

- Eckhart, W., Hutchinson, M. A., et Hunter, T. (1979). An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* 18, 925-933. doi:10.1016/0092-8674(79)90205-8.
- Engelman, J. A., et Settleman, J. (2008). Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 73-9. doi:10.1016/j.gde.2008.01.004.

-F-

- Faust, E., Jones, C., et WA, H. (1934). « Studies on schistosomiasis in Puerto Rico. », in *Puerto Rican Journal of Public Health and Tropical Medicine*, 133-196.
- Feng, S., Chen, J. K., Yu, H., Simon, J. A., et Schreiber, S. L. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* 266, 1241-7.
- Ferrari, T. C. A., et Moreira, P. R. R. (2011). Neuroschistosomiasis: clinical symptoms and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 10, 853-864. doi:10.1016/S1474-4422(11)70170-3.
- Fischer, E. H., et Krebs, E. G. (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 216, 121-32.
- Fitzpatrick, J. M., Hirai, Y., Hirai, H., et Hoffmann, K. F. (2007). Schistosome egg production is dependent upon the activities of two developmentally regulated tyrosinases. *FASEB J.* 21, 823 - 35. doi:10.1096/fj.06-7314com.
- Freitas, T. C., Jung, E., et Pearce, E. J. (2007). TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 3, e52. doi:10.1371/journal.ppat.0030052.

-G-

- Gelmedin, V., Dissous, C., et Grevelding, C. G. (2015). Re-positioning protein-kinase inhibitors against schistosomiasis. *Future Med. Chem.* 7, 737-52. doi:10.4155/fmc.15.31.
- Gönnert, R. (1955). [Schistosomiasis studies. II. Oogenesis of *Schistosoma mansoni* and the development of the eggs in the host organism]. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitol.* 6, 33-52.
- Gouignard, N. (2011). Caractérisation moléculaire des Récepteurs Venus Kinase : étude fonctionnelle chez le parasite *Schistosoma mansoni*.
- Gouignard, N., Vanderstraete, M., Cailliau, K., Lescuyer, A., Browaeys, E., et Dissous, C. (2012). *Schistosoma mansoni*: structural and biochemical characterization of two distinct Venus Kinase Receptors. *Exp. Parasitol.* 132, 32-9. doi:10.1016/j.exppara.2011.05.007.
- Gray, D. J., Ross, A. G., Li, Y.-S., et McManus, D. P. (2011). Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ* 342, d2651.
- Gross, S., Rahal, R., Stransky, N., Lengauer, C., et Hoeflich, K. P. (2015). Targeting cancer with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 125, 1780-9. doi:10.1172/JCI76094.
- Gustafsson, K., Calounova, G., Hjelm, F., Kriz, V., Heyman, B., Grönvik, K.-O., et al. (2011). Shb deficient mice display an augmented TH2 response in peripheral CD4+ T cells. *BMC Immunol.* 12, 3. doi:10.1186/1471-2172-12-3.
- Gustafsson, K., Heffner, G., Wenzel, P. L., Curran, M., Grawé, J., McKinney-Freeman, S. L., et al. (2013). 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.* 319, 1852 - 64. doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.020.

-H-

- Haeberlein, S., et Haas, W. (2008). Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitol. Res.* 102, 657-62. doi:10.1007/s00436-007-0807-1.
- Hägerkvist, R., Mokhtari, D., Lindholm, C., Farnebo, F., Mostoslavsky, G., Mulligan, R. C., et al. (2007). Consequences of Shb and c-Abl interactions for cell death in response to various stress stimuli. *Exp. Cell Res.* 313, 284-91. doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.011.
- Hahnel, S., Quack, T., Parker-Manuel, S. J., Lu, Z., Vanderstraete, M., Morel, M., et al. (2014). Gonad RNA-specific qRT-PCR analyses identify genes with potential functions in schistosome reproduction such as SmFz1 and SmFGFRs. *Front. Genet.* 5, 170. doi:10.3389/fgene.2014.00170.
- Hams, E., Aviello, G., et Fallon, P. G. (2013). The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front. Immunol.* 4, 89. doi:10.3389/fimmu.2013.00089.
- Hanks, S. K., et Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576-96. doi:7768349.
- Ho, Y., et Yang, H. (1974). Histological and histochemical studies on the egg formation of *Schistosoma japonicum*. *Acta Zool. Sin.* 20, 256-258.
- Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hägerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., et al. (2004). The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J. Biol. Chem.* 279, 22267 - 75. doi:10.1074/jbc.M312729200.
- Hooshmand-Rad, R., Lu, L., Heldin, C. H., Claesson-Welsh, L., et Welsh, M. (2000). Platelet-derived growth factor-mediated signaling through the Shb adaptor protein: effects on cytoskeletal organization. *Exp. Cell Res.* 257, 245-54. doi:10.1006/excr.2000.4896.
- Hordijk, P. L., Ebberink, R. H., de Jong-Brink, M., et Joesse, J. (1991). Isolation of schistosomin, a neuropeptide which antagonizes gonadotropic hormones in a freshwater snail. *Eur. J. Biochem.* 195, 131-6.
- Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.* 357, 39-51. doi:10.1056/NEJMra043186.
- Hunter, T., et Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1311-5.

-J-

- Jurberg, A. D., Gonçalves, T., Costa, T. A., de Mattos, A. C. A., Pascarelli, B. M., de Manso, P. P. A., et al. (2009). The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Dev. Genes Evol.* 219, 219-34. doi:10.1007/s00427-009-0285-9.

-K-

- Kapp, K., Knobloch, J., Schüssler, P., Sroka, S., Lammers, R., Kunz, W., et al. (2004). The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 171-82. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.07.010.
- Karlsson, T., Kullander, K., et Welsh, M. (1998). The Src homology 2 domain protein Shb transmits basic fibroblast growth factor- and nerve growth factor-dependent differentiation signals in PC12 cells. *Cell Growth Differ.* 9, 757-66.

- Karlsson, T., Songyang, Z., Landgren, E., Lavergne, C., Di Fiore, P. P., Anafi, M., et al. (1995). Molecular interactions of the Src homology 2 domain protein Shb with phosphotyrosine residues, tyrosine kinase receptors and Src homology 3 domain proteins. *Oncogene* 10, 1475-83.
- Katsumata, T., Kohno, S., Yamaguchi, K., Hara, K., et Aoki, Y. (1989). Hatching of *Schistosoma mansoni* eggs is a Ca²⁺/calmodulin-dependent process. *Parasitol. Res.* 76, 90-1.
- Kawamoto, F., Shozawa, A., Kumada, N., et Kojima, K. (1989). Possible roles of cAMP and Ca²⁺ in the regulation of miracidial transformation in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 75, 368-74.
- Khayath, N., Vicogne, J., Ahier, A., BenYounes, A., Konrad, C., Trolet, J., et al. (2007). Diversification of the insulin receptor family in the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *FEBS J.* 274, 659-76. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05610.x.
- Kidd, A. R., Muñiz-Medina, V., Der, C. J., Cox, A. D., et Reiner, D. J. (2015). The *C. elegans* Chp/Wrch Ortholog CHW-1 Contributes to LIN-18/Ryk and LIN-17/Frizzled Signaling in Cell Polarity. *PLoS One* 10, e0133226. doi:10.1371/journal.pone.0133226.
- Kim, J. J., et Accili, D. (2002). Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Horm. IGF Res.* 12, 84-90.
- Kjetland, E. F., Leutscher, P. D. C., et Ndhlovu, P. D. (2012). A review of female genital schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 28, 58-65. doi:10.1016/j.pt.2011.10.008.
- Knobloch, J., Beckmann, S., Burmeister, C., Quack, T., et Grevelding, C. G. (2007). Tyrosine kinase and cooperative TGFbeta signaling in the reproductive organs of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 117, 318-36. doi:10.1016/j.exppara.2007.04.006.
- Knobloch, J., Kunz, W., et Grevelding, C. G. (2006). Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 36, 1261 - 72. doi:10.1016/j.ijpara.2006.06.004.
- Knobloch, J., Rossi, A., Osman, A., LoVerde, P. T., Klinkert, M.-Q., et Grevelding, C. G. (2004). Cytological and biochemical evidence for a gonad-preferential interplay of SmFKBP12 and SmTbetaR-I in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 227 - 36. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.09.006.
- Knobloch, J., Winnen, R., Quack, M., Kunz, W., et Grevelding, C. G. (2002). A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene* 294, 87-97.
- Kornev, A. P., Haste, N. M., Taylor, S. S., et Eyck, L. F. Ten (2006). Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17783-8. doi:10.1073/pnas.0607656103.
- Kornev, A. P., Taylor, S. S., et Ten Eyck, L. F. (2008). A helix scaffold for the assembly of active protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14377-82. doi:10.1073/pnas.0807988105.
- Korrodi-Gregorio, L., Vieira, S. I., Esteves, S. L. C., Silva, J. V., Freitas, M. J., Brauns, A.-K., et al. (2013). TCTEX1D4, a novel protein phosphatase 1 interactor: connecting the phosphatase to the microtubule network. *Biol. Open* 2, 453-465. doi:10.1242/bio.20131065.
- Kriz, V., Mares, J., Wentzel, P., Funa, N. S., Calounova, G., Zhang, X.-Q., et al. (2007). Shb null allele is inherited with a transmission ratio distortion and causes reduced viability in utero. *Dev. Dyn.* 236, 2485-92. doi:10.1002/dvdy.21257.

- Lemmon, M. a., et Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Leonard, C. J., Aravind, L., et Koonin, E. V. (1998). Novel Families of Putative Protein Kinases in Bacteria and Archaea: Evolution of the « Eukaryotic » Protein Kinase Superfamily. *Genome Res.* 8, 1038-1047. doi:10.1101/gr.8.10.1038.
- Leutner, S., Beckmann, S., et Grevelding, C. G. (2011). Characterization of the cGMP-dependent protein kinase SmcGK1 of *Schistosoma mansoni*. *An. da Acad. Bras. Ciências* 83, 637-48.
- Li, A., Saito, M., Chuang, J.-Z., Tseng, Y.-Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., et al. (2011). Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat. Cell Biol.* 13, 402-11. doi:10.1038/ncb2218.
- Lindholm, C. K., Frantz, J. D., Shoelson, S. E., et Welsh, M. (2000). Shf, a Shb-like adapter protein, is involved in PDGF- α -receptor regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 537-43. doi:10.1006/bbrc.2000.3847.
- Lindholm, C. K., Gylfe, E., Zhang, W., Samelson, L. E., et Welsh, M. (1999). Requirement of the Src Homology 2 Domain Protein Shb for T Cell Receptor-dependent Activation of the Interleukin-2 Gene Nuclear Factor for Activation of T Cells Element in Jurkat T Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 28050-28057. doi:10.1074/jbc.274.39.28050.
- Liu, B. A., Jablonowski, K., Raina, M., Arcé, M., Pawson, T., et Nash, P. D. (2006). The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. *Mol. Cell* 22, 851-68. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.001.
- Liu, C., Chuang, J.-Z., Sung, C.-H., et Mao, Y. (2015). A dynein independent role of Tctex-1 at the kinetochore. *Cell Cycle* 14, 1379-88. doi:10.1080/15384101.2014.1000217.
- Liu, Y., Wang, X., Wang, J.-K., et Ching, C. B. (2004). Structural characterization and enantioseparation of the chiral compound praziquantel. *J. Pharm. Sci.* 93, 3039-46. doi:10.1002/jps.20211.
- Loker, E. S., et Brant, S. V (2006). Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends Parasitol.* 22, 521-8. doi:10.1016/j.pt.2006.09.001.
- Long, T., Cailliau, K., Beckmann, S., Browaeys, E., Trolet, J., Grevelding, C. G., et al. (2010). *Schistosoma mansoni* Polo-like kinase 1: A mitotic kinase with key functions in parasite reproduction. *Int. J. Parasitol.* 40, 1075-86. doi:10.1016/j.ijpara.2010.03.002.
- Long, T., Vanderstraete, M., Cailliau, K., Morel, M., Lescuyer, A., Gouignard, N., et al. (2012). SmSak, the second Polo-like kinase of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*: conserved and unexpected roles in meiosis. *PLoS One* 7, e40045. doi:10.1371/journal.pone.0040045.
- Ludolf, F., Bahia, D., Andrade, L. F., Cousin, A., Capron, M., Dissous, C., et al. (2007). Molecular analysis of SmFes, a tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* orthologous to the members of the Fes/Fps/Fer family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 163 - 72. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.018.
- Ludtmann, M. H. R., Rollinson, D., Emery, A. M., et Walker, A. J. (2009). Protein kinase C signalling during miracidium to mother sporocyst development in the helminth parasite, *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 39, 1223-33. doi:10.1016/j.ijpara.2009.04.002.

-M-

- Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., et Sudarsanam, S. (2002a). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27, 514-520. doi:S0968000402021795 [pii].
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., et Sudarsanam, S. (2002b). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-34. doi:10.1126/science.1075762.
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., et al. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* 2, 232 - 60. doi:10.1177/1947601911407323.
- Matsuyama, H., Takahashi, H., Watanabe, K., Fujimaki, Y., et Aoki, Y. (2004). The involvement of cyclic adenosine monophosphate in the control of schistosome miracidium cilia. *J. Parasitol.* 90, 8-14. doi:10.1645/GE-52R1.
- McKay, M. M., et Morrison, D. K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 26, 3113-21. doi:10.1038/sj.onc.1210394.
- Miyake, Z., Takekawa, M., Ge, Q., et Saito, H. (2007). Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2765-76. doi:10.1128/MCB.01435-06.
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011254 - . doi:10.1101/cshperspect.a011254.

-N-

- Neill, P. J., Smith, J. H., Doughty, B. L., et Kemp, M. (1988). The ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* egg. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 52-65.
- Neves, R. H., De Lamare Biolchini, C., Machado-Silva, J. R., Carvalho, J. J., Branquinho, T. B., Lenzi, H. L., 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. doi:10.1007/s00436-004-1241-2.
- Nollen, P. M. (1983). Patterns of sexual reproduction among parasitic platyhelminths. *Parasitology* 86 (Pt 4), 99-120.

-O-

- Oda, T., Kujovich, J., Reis, M., Newman, B., et Druker, B. J. (1997). Identification and characterization of two novel SH2 domain-containing proteins from a yeast two hybrid screen with the ABL tyrosine kinase. *Oncogene* 15, 1255-62. doi:10.1038/sj.onc.1201299.
- Ory, S., Brazier, H., et Blangy, A. (2007). Identification of a bipartite focal adhesion localization signal in RhoU/Wrch-1, a Rho family GTPase that regulates cell adhesion and migration. *Biol. Cell* 99, 701-16. doi:10.1042/BC20070058.
- Osman, A., Niles, E. G., et LoVerde, P. T. (2001). Identification and characterization of a Smad2 homologue from *Schistosoma mansoni*, a transforming growth factor-beta signal transducer. *J. Biol. Chem.* 276, 10072-82. doi:10.1074/jbc.M005933200.
- Osman, A., Niles, E. G., Verjovski-Almeida, S., et LoVerde, P. T. (2006). *Schistosoma mansoni* TGF-beta receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathog.* 2, e54. doi:10.1371/journal.ppat.0020054.

-P-

- Pan, S. C. (1980). The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. *J. Invertebr. Pathol.* 36, 307-372. doi:10.1016/0022-2011(80)90040-3.
- Parikh, C., Janakiraman, V., Wu, W.-I., Foo, C. K., Kljavin, N. M., Chaudhuri, S., et al. (2012). Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 19368-73. doi:10.1073/pnas.1204384109.
- Parnas, J. (1936). L'enchainement des processus enzymatiques dans le tissu musculaire. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 18, 53-95.
- Pearce, L. R., Komander, D., et Alessi, D. R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 9-22. doi:10.1038/nrm2822.
- Pica-Mattoccia, L., et Cioli, D. (2004). Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int. J. Parasitol.* 34, 527 - 33. doi:10.1016/j.ijpara.2003.12.003.
- Pin, J.-P., Galvez, T., et Prézeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 98, 325-354. doi:10.1016/S0163-7258(03)00038-X.
- Popiel, I., et Basch, P. F. (1984). Reproductive development of female *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) following bisexual pairing of worms and worm segments. *J. Exp. Zool.* 232, 141-50. doi:10.1002/jez.1402320117.

-Q-

- Quack, T., Knobloch, J., Beckmann, S., Vicogne, J., Dissous, C., et Grevelding, C. G. (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. doi:10.1371/journal.pone.0006998.

-R-

- Ramachandran, H., Skelly, P. J., et Shoemaker, C. B. (1996). The *Schistosoma mansoni* epidermal growth factor receptor homologue, SER, has tyrosine kinase activity and is localized in adult muscle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 1-10.
- Ressurreição, M., Rollinson, D., Emery, A. M., et Walker, A. J. (2011a). A role for p38 MAPK in the regulation of ciliary motion in a eukaryote. *BMC Cell Biol.* 12, 6. doi:10.1186/1471-2121-12-6.
- Ressurreição, M., Rollinson, D., Emery, A. M., et Walker, A. J. (2011b). A role for p38 mitogen-activated protein kinase in early post-embryonic development of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 180, 51-5. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.07.002.
- Ressurreição, M., De Saram, P., Kirk, R. S., Rollinson, D., Emery, A. M., Page, N. M., et al. (2014). Protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase regulate movement, attachment, pairing and egg release in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2924. doi:10.1371/journal.pntd.0002924.
- Rinaldi, G., Morales, M. E., Alrefaei, Y. N., Cancela, M., Castillo, E., Dalton, J. P., et al. (2009). RNA interference targeting leucine aminopeptidase blocks hatching of *Schistosoma mansoni* eggs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 167, 118-26. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.05.002.

Rossomando, A. J., Payne, D. M., Weber, M. J., et Sturgill, T. W. (1989). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6940-3.

Roszkowski, P., Maurin, J. K., et Czarnocki, Z. (2006). Enantioselective synthesis of (R)-(-)-praziquantel (PZQ). *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 1415-1419. doi:10.1016/j.tetasy.2006.04.023.

-S-

Sabah, A. A., Fletcher, C., Webbe, G., et Doenhoff, M. J. (1986). Schistosoma mansoni: chemotherapy of infections of different ages. *Exp. Parasitol.* 61, 294-303.

Sadowski, I., Stone, J. C., et Pawson, T. (1986). A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4396-408.

Sahai, E., et Marshall, C. J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 133 - 42. doi:10.1038/nrc725.

Santini-Oliveira, M., Coler, R. N., Parra, J., Veloso, V., Jayashankar, L., Pinto, P. M., et al. (2015). Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2015.10.027.

de Saram, P. S. R., Ressurreição, M., Davies, A. J., Rollinson, D., Emery, A. M., et Walker, A. J. (2013). Functional mapping of protein kinase A reveals its importance in adult Schistosoma mansoni motor activity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e1988. doi:10.1371/journal.pntd.0001988.

Saras, J., Wollberg, P., et Aspenström, P. (2004). Wrch1 is a GTPase-deficient Cdc42-like protein with unusual binding characteristics and cellular effects. *Exp. Cell Res.* 299, 356 - 69. doi:10.1016/j.yexcr.2004.05.029.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., et Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-101. doi:10.1126/science.1106148.

Savaya Alkalay, A., Rosen, O., Sokolow, S. H., Faye, Y. P. W., Faye, D. S., Aflalo, E. D., et al. (2014). The prawn *Macrobrachium vollenhovenii* in the Senegal River basin: towards sustainable restocking of all-male populations for biological control of schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3060. doi:10.1371/journal.pntd.0003060.

Schlessinger, J., et Lemmon, M. A. (2003). SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci. STKE* 2003, RE12. doi:10.1126/stke.2003.191.re12.

Sergina, N. V, et Moasser, M. M. (2007). The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol. Med.* 13, 527-34. doi:10.1016/j.molmed.2007.10.002.

Shaul, Y. D., et Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1213-26. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.005.

Shepelev, M. V, et Korobko, I. V (2012). Pak6 protein kinase is a novel effector of an atypical Rho family GTPase Chp/RhoV. *Biochem. Biokhimiia* 77, 26-32. doi:10.1134/S0006297912010038.

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

Siddiqui, A. A., Ahmad, G., Damian, R. T., et Kennedy, R. C. (2008). Experimental vaccines in animal models for schistosomiasis. *Parasitol. Res.* 102, 825-33. doi:10.1007/s00436-008-0887-6.

- Siddiqui, A. A., Zhou, Y., Podesta, R. B., Karcz, S. R., Tognon, C. E., Strejan, G. H., et al. (1993). Characterization of Ca(2+)-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, *Schistosoma mansoni*. *Biochim. Biophys. Acta* 1181, 37-44.
- Skelly, P. J., et Shoemaker, C. B. (1996). 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.* 93, 3642-6.
- Sokolow, S. H., Huttinger, E., Jouanard, N., Hsieh, M. H., Lafferty, K. D., Kuris, A. M., et al. (2015). Reduced transmission of human schistosomiasis after restoration of a native river prawn that preys on the snail intermediate host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 9650 - 5. doi:10.1073/pnas.1502651112.
- Stahl, M. L., Ferez, C. R., Kelleher, K. L., Kriz, R. W., et Knopf, J. L. (1988). Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature* 332, 269-72. doi:10.1038/332269a0.
- Stelma, F. F., Talla, I., Sow, S., Kongs, A., Niang, M., Polman, K., et al. (1995). Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 167-70.
- Stroehlein, A. J., Young, N. D., Jex, A. R., Sternberg, P. W., Tan, P., Boag, P. R., et al. (2015). Defining the *Schistosoma haematobium* kinome enables the prediction of essential kinases as anti-schistosome drug targets. *Sci. Rep.* 5, 17759. doi:10.1038/srep17759.
- Suh, P. G., Ryu, S. H., Moon, K. H., Suh, H. W., et Rhee, S. G. (1988). Inositol phospholipid-specific phospholipase C: complete cDNA and protein sequences and sequence homology to tyrosine kinase-related oncogene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5419-23.
- Sutherland, E. W., et Rall, T. W. (1960). The relation of adenosine-3', 5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. *Pharmacol. Rev.* 12, 265-299.
- Swierczewski, B. E., et Davies, S. J. (2009). A schistosome cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is essential for parasite viability. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e505. doi:10.1371/journal.pntd.0000505.
- Swierczewski, B. E., et Davies, S. J. (2010a). Conservation of protein kinase a catalytic subunit sequences in the schistosome pathogens of humans. *Exp. Parasitol.* 125, 156 - 60. doi:10.1016/j.exppara.2010.01.012.
- Swierczewski, B. E., et Davies, S. J. (2010b). Developmental regulation of protein kinase A expression and activity in *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 40, 929 - 35. doi:10.1016/j.ijpara.2010.01.001.

-T-

- Tao, W., Pennica, D., Xu, L., Kalejta, R. F., et Levine, A. J. (2001). Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev.* 15, 1796-807. doi:10.1101/gad.894301.
- Taylor, S. S., Keshwani, M. M., Steichen, J. M., et Kornev, A. P. (2012). Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 2517 -28. doi:10.1098/rstb.2012.0054.
- Taylor, S. S., et Kornev, A. P. (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 36, 65-77. doi:10.1016/j.tibs.2010.09.006.
- Taylor, S. S., et Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* 2, 345-55.

- Tendler, M., et Simpson, A. J. G. (2008). The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. *Acta Trop.* 108, 263-6. doi:10.1016/j.actatropica.2008.09.002.
- Thien, C. B., et Langdon, W. Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 294-307. doi:10.1038/35067100.
- Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G. A., Ladner, M., et al. (1988). Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science* 242, 1697-700.
- Tran, M. H., Pearson, M. S., Bethony, J. M., Smyth, D. J., Jones, M. K., Duke, M., et al. (2006). Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nat. Med.* 12, 835-40. doi:10.1038/nm1430.
- Turner, N., et Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 116-29. doi:10.1038/nrc2780.

-V-

- Vanderstraete, M., Gougnard, N., Ahier, A., Morel, M., Vicogne, J., et Dissous, C. (2013a). The venus kinase receptor (VKR) family: structure and evolution. *BMC Genomics* 14, 361. doi:10.1186/1471-2164-14-361.
- Vanderstraete, M., Gougnard, N., Cailliau, K., Morel, M., Hahnel, S., Leutner, S., et al. (2014). Venus kinase receptors control reproduction in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 10, e1004138. doi:10.1371/journal.ppat.1004138.
- Vanderstraete, M., Gougnard, N., Cailliau, K., Morel, M., Lancelot, J., Bodart, J.-F., et al. (2013b). Dual targeting of insulin and venus kinase Receptors of *Schistosoma mansoni* for novel anti-schistosome therapy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2226. doi:10.1371/journal.pntd.0002226.
- Varjosalo, M., Kesitalo, S., Van Drogen, A., Nurkkala, H., Vichalkovski, A., Aebersold, R., et al. (2013). The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. *Cell Rep.* 3, 1306-20. doi:10.1016/j.celrep.2013.03.027.
- Vicogne, J., Cailliau, K., Tulasne, D., Browaey, E., Yan, Y. T., Fafeur, V., et al. (2004). Conservation of Epidermal Growth Factor Receptor Function in the Human Parasitic Helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 279, 37407-37414. doi:10.1074/jbc.M313738200.
- Vicogne, J., Pin, J.-P. P., Lardans, V., Capron, M., Noël, C., et Dissous, C. (2003). An unusual receptor tyrosine kinase of *Schistosoma mansoni* contains a Venus Flytrap module. *Mol. Biochem. Parasitol.* 126, 51-62. doi:10.1016/S0166-6851(02)00249-9.
- Vogel, K. J., Brown, M. R., et Strand, M. R. (2015). Ovary ecdysteroidogenic hormone requires a receptor tyrosine kinase to activate egg formation in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 5057-62. doi:10.1073/pnas.1501814112.
- Vogel, U. S., Dixon, R. A., Schaber, M. D., Diehl, R. E., Marshall, M. S., Scolnick, E. M., et al. (1988). Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature* 335, 90-3. doi:10.1038/335090a0.

-W-

- Walsh, D. A., Perkins, J. P., et Krebs, E. G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 243, 3763-5.
- Wang, B., Collins, J. J., et Newmark, P. A. (2013). Functional genomic characterization of neoblast-like stem cells in larval *Schistosoma mansoni*. *Elife* 2, e00768. doi:10.7554/eLife.00768.

- Webster, B. L., et Littlewood, D. T. J. (2012). Mitochondrial gene order change in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea: Schistosomatidae). *Int. J. Parasitol.* 42, 313 - 321. doi:10.1016/j.ijpara.2012.02.001.
- Weerakoon, K. G. A. D., Gobert, G. N., Cai, P., et McManus, D. P. (2015). Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 939-67. doi:10.1128/CMR.00137-14.
- Welsh, M., Jamalpour, M., Zang, G., et Åkerblom, B. (2016). The role of the Src Homology-2 domain containing protein B (SHB) in β cells. *J. Mol. Endocrinol.* 56, R21-31. doi:10.1530/JME-15-0228.
- Welsh, M., Mares, J., Karlsson, T., Lavergne, C., Bréant, B., et Claesson-Welsh, L. (1994). Shb is a ubiquitously expressed Src homology 2 protein. *Oncogene* 9, 19-27.
- Weston, C. R., et Davis, R. J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 142-9. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.001.
- WHO (2014). Status of Vaccine Research and Development of Vaccines for Schistosomiasis. http://www.who.int/immunization/research/meetings_workshops/Schistosomiasis_VaccineRD_Sept2014.pdf
- WHO (2015). Weekly epidemiological record. *WHO Wkly. Epidemiol. Rec.* No. 5, 25-32.
- Wiest, P. M., Burnham, D. C., Olds, G. R., et Bowen, W. D. (1992). Developmental expression of protein kinase C activity in *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 358-65.
- Wilson, R. A. (1987). « Development and migration in the mammalian host », in *The Biology of Schistosomes From Genes to Latrines.*, éd. D. Rollinson et A. Simpson (London), 115-146.
- Wrana, J. L. (2000). Regulation of Smad activity. *Cell* 100, 189-92.
- Wu, H., Maciejewski, M. W., Takebe, S., et King, S. M. (2005). Solution structure of the Tctex1 dimer reveals a mechanism for dynein-cargo interactions. *Structure* 13, 213 - 23. doi:10.1016/j.str.2004.11.013.

-X-

- Xu, Y.-Z., et Dresden, M. H. (1990). The hatching of schistosome eggs. *Exp. Parasitol.* 70, 236-240. doi:10.1016/0014-4894(90)90104-K.

-Y-

- Yan, K. S., Kuti, M., et Zhou, M. M. (2002). PTB or not PTB -- that is the question. *FEBS Lett.* 513, 67-70.
- Yan, Y., Tulasne, D., Browaeys, E., Cailliau, K., Khayath, N., Pierce, R. J., et al. (2007). Molecular cloning and characterisation of SmSLK, a novel Ste20-like kinase in *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 37, 1539-50. doi:10.1016/j.ijpara.2007.06.001.
- Yeh, C., Li, A., Chuang, J.-Z., Saito, M., Cáceres, A., et Sung, C.-H. (2013). IGF-1 activates a cilium-localized noncanonical G β signaling pathway that regulates cell-cycle progression. *Dev. Cell* 26, 358-68. doi:10.1016/j.devcel.2013.07.014.
- You, H., Gobert, G. N., Cai, P., Mou, R., Nawaratna, S., Fang, G., et al. (2015). Suppression of the Insulin Receptors in Adult *Schistosoma japonicum* Impacts on Parasite Growth and Development: Further Evidence of Vaccine Potential. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003730. doi:10.1371/journal.pntd.0003730.

You, H., Gobert, G. N., Duke, M. G., Zhang, W., Li, Y., Jones, M. K., et al. (2012). The insulin receptor is a transmission blocking veterinary vaccine target for zoonotic *Schistosoma japonicum*. *Int. J. Parasitol.* 42, 801-807. doi:10.1016/j.ijpara.2012.06.002.

You, H., Zhang, W., Jones, M. K., Gobert, G. N., Mulvenna, J., Rees, G., et al. (2010). Cloning and characterisation of *Schistosoma japonicum* insulin receptors. *PLoS One* 5, e9868. doi:10.1371/journal.pone.0009868.

-Z-

Zhang, J.-S., Koenig, A., Young, C., et Billadeau, D. D. (2011). GRB2 couples RhoU to epidermal growth factor receptor signaling and cell migration. *Mol. Biol. Cell* 22, 2119-30. doi:10.1091/mbc.E10-12-0969.

Zhang, S.-M., Nian, H., Wang, B., Loker, E. S., et Adema, C. M. (2009). Schistosomin from the snail *Biomphalaria glabrata*: expression studies suggest no involvement in trematode-mediated castration. *Mol. Biochem. Parasitol.* 165, 79-86. doi:10.1016/j.molbiopara.2009.01.006.

Zheng, C. F., Ohmichi, M., Saltiel, A. R., et Guan, K. L. (1994). Growth factor induced MEK activation is primarily mediated by an activator different from c-raf. *Biochemistry* 33, 5595-9.

Zhou, M. M., et Fesik, S. W. (1995). Structure and function of the phosphotyrosine binding (PTB) domain. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 64, 221-35.

Zitouni, S., Nabais, C., Jana, S. C., Guerrero, A., et Bettencourt-Dias, M. (2014). Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 433 - 52. doi:10.1038/nrm3819