

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

Discipline : Parasitologie et mycologie

Présentée et soutenue publiquement par

Lucile PAGLIAZZO

Le 27 septembre 2018

Rôles biologiques de l'histone désacétylase 8 chez le parasite
plathelminthe *Schistosoma mansoni*

Devant le jury composé de :

Président : **Professeur El Moukhtar ALIOUAT**

Rapporteurs : **Docteur Céline COSSEAU**
Docteur Elisabeth DAVIOUD-CHARVET

Examineurs : **Docteur Isabelle LANDRIEU**
Docteur Christophe ROMIER
Docteur Raymond J. PIERCE

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

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 mes travaux de thèse au sein de cette structure.

Je remercie particulièrement le Pr El Moukhtar Aliouat de me faire le plaisir de présider mon jury de thèse ainsi que le Dr Céline Cosseau et le Dr Elisabeth Davioud- Charvet pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail. Je remercie également les Drs Isabelle Landrieu et Christophe Romier pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je remercie le Dr Oleg Melnyk et le Dr Jérôme Vicogne, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe 1 du CILL, « Chemical Biology of Flatworms ». Merci pour votre écoute et vos conseils.

Je remercie le Dr Jamal khalife, qui dirige l'équipe 2 du CILL, au sein de laquelle j'ai effectué mes deux premières années de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr Raymond Pierce de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec lui et au sein de son groupe. Ce fut une chance pour moi et je vous en remercie ! Merci également, pour votre gentillesse, votre expérience, vos conseils et de m'avoir toujours fait confiance pour ce projet.

Merci au Dr Colette Dissous, pour sa gentillesse et ses nombreux conseils. Et vous avez raison, nous n'étudions pas le schisto pour « l'éliminer » mais parce qu'il est passionnant !

Merci aussi aux Drs Mathieu Gissot et Martine Duterque, d'avoir suivi ce projet dans le cadre du Comité de Suivi Individuel.

J'aimerais également adresse un immense merci à Stéphanie Caby, ingénieur d'études qui m'a encadré toutes ces années passées au laboratoire. Merci de m'avoir transmis tout ce que tu savais avec passion et patience. Merci pour tes encouragements, pour son soutien, pour tous ces « ne t'inquiète pas Lucile, ça va aller ! », pour toutes ces conversations scientifiques (ou pas !) en pièce de culture cellulaire, de levure, dans les couloirs, en bacterio, entre deux portes ! Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité (même pendant tes mercredis et tes vacances !!), pour tous tes « Lucile, envois-moi un petit message, dès que tu as un résultat » ainsi que pour tes nombreux et précieux conseils. Merci pour ton honnêteté, ta spontanéité et ta bonne humeur. Je pense que je n'oublierais pas tous nos fous rires, nos galères avec ces chères petites bestioles (celles à poils et celles à tubercules ^^) ainsi que nos superbes blousses jaunes de la mort ! Je n'en serais pas là aujourd'hui si tu n'avais

pas été là. Je te dois tout donc MERCI d'avoir croisé ma route et d'avoir partagé cette improbable aventure avec moi.

Je souhaite également remercier le Dr Julien Lancelot, pour sa gentillesse et sa bienveillance. Merci Julien pour toute l'aide que tu m'as apportée, pour tous tes conseils et pour tous les rapports de stage, mémoires bibliographiques, présentations et j'en passe... que tu as relus et corrigés et re-relus et re-recorrigés !

Un grand merci à mes collègues de bureaux et paillasse, anciens comme nouveaux : Marion, Gégé, Astrid, Bénédicte, Cécilia, Thomas, Aline et Alejandro. Merci pour votre aide, pour nos nombreuses discussions et fous rires ainsi que votre soutien au quotidien. Merci pour tous ces bons moments !

Merci également à tous les membres de l'équipe 1 et 2 du CILL ainsi qu'à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de près ou de loin au cours de ma thèse.

Pour finir, je tiens à remercier mes grands-parents et particulièrement mon père. Merci pour tous les sacrifices que tu as faits. La vie n'a pas toujours été facile avec nous mais tu m'as appris la valeur du travail et tu m'as toujours poussé à aller plus loin. Manu, merci d'avoir été là, tout simplement. On sait tous les deux que tu n'étais pas obligé de tout quitter pour moi, pour ça... mais tu l'as fait et je n'y serais jamais arrivée sans toi !

La schistosomiase est la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme puisqu'en 2016, environ 200 millions de personnes ont été traitées pour cette parasitose. Plusieurs espèces de schistosomes peuvent être la cause de cette maladie dont *Schistosoma mansoni*, responsable de la schistosomiase intestinale. Son cycle de vie est complexe et comprend deux hôtes : un hôte définitif vertébré, l'Humain et un hôte intermédiaire qui est un mollusque d'eau douce. Actuellement, un seul médicament, le Praziquantel, est utilisé contre toutes les espèces de schistosomes, mais son utilisation de façon massive et répétée a favorisé l'émergence de souches parasitaire tolérantes et/ou résistantes. La nécessité de trouver de nouveaux médicaments et de nouveaux traitements est donc devenue impérative.

Les lysines désacétylases ou KDACs constituent des cibles thérapeutiques intéressantes, notamment parce que ce sont des enzymes impliquées dans des processus cellulaires essentiels tels que la régulation de l'expression des gènes et du cycle cellulaire, ou encore la différenciation cellulaire. À ce jour, des inhibiteurs de KDACs sont déjà approuvés dans le traitement du cancer et d'autres sont en essais cliniques.

Chez *S. mansoni*, trois KDACs de classe I ont été identifiées : HDAC 1, 3 et 8. D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de KDACs a démontré qu'il était possible d'induire l'apoptose et la mort de parasites en culture. Des études réalisées sur la protéine HDAC8 humaine et SmHDAC8 ont montré qu'il existait des différences significatives au niveau de la poche catalytique entre ces deux protéines. Ces données soulignent l'intérêt de développer des inhibiteurs sélectifs de SmHDAC8. Il est devenu, néanmoins essentiel de déterminer le rôle de SmHDAC8 dans la biologie du parasite et notamment ses partenaires protéiques. De ce fait, la première partie de ce travail de thèse s'est focalisé sur la mise en évidence de l'interactome de l'enzyme parasitaire SmHDAC8. Par l'utilisation du système en double hybride chez la levure et de la co-immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse, nous avons identifié plusieurs partenaires de SmHDAC8 qui sont impliqués dans des processus essentiels à la cellule tels que la régulation de la transcription et de la traduction, le cycle cellulaire, le métabolisme, la réparation de l'ADN, la protéolyse ou encore le transport des protéines. Parmi ces interactants, nous avons également retrouvé la GTPase SmRho1 suggérant que l'enzyme SmHDAC8 serait impliquée dans la modulation de l'organisation du cytosquelette.

Dans une seconde partie, nous nous sommes donc intéressés à l'interaction entre SmHDAC8 et la GTPase SmRho1. Nous avons initialement démontré que cette interaction était bien présente chez le parasite et notamment chez les vers adultes et les schistosomules. L'acétylation de SmRho1 sur la lysine K136 a également été mise en évidence par spectrométrie de masse et nous avons aussi pu observer un effet de l'inhibition de SmHDAC8 sur l'organisation du cytosquelette d'actine chez le parasite.

Deux isoformes de SmRho1 (SmRho1.1 et SmRho1.2) ont été identifiées et caractérisées. La technique du double hybride chez la levure et la co-immunoprécipitation en ovocytes de xénope, a permis de démontrer que

seule SmRho1.1 pouvait interagir avec SmHDAC8. Enfin, la caractérisation des motifs d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1, par co-immunoprécipitation en ovocytes de xénope, suggère que le domaine C-terminal de SmRho1 serait impliqué dans cette interaction. Ces données sont en faveur d'un rôle potentiel de SmHDAC8 dans la modulation du cytosquelette d'actine *via* son interaction spécifique avec la GTPase SmRho1.1.

Abstract

Schistosoma mansoni is the major parasitic platyhelminth species causing intestinal schistosomiasis, for which more than 200 million people are in need of treatment. The schistosome life cycle is complex and includes two hosts: a definitive mammalian host, mainly humans in the case of *S. mansoni*, and an intermediate snail host. Currently one drug, praziquantel, is the treatment of choice against all species of schistosomes, but tolerant/resistant strains have been isolated in endemic areas following its extensive use in mass treatment programs, as well as in laboratory studies. The need to find new drugs and new treatments is therefore imperative.

Lysine deacetylases (KDACs) form a family of enzymes that are conserved in metazoans. They are attractive therapeutic targets in a variety of pathologies, particularly cancer, because they are involved in the regulation of gene transcription and several KDAC inhibitors have already been approved as drugs. Our previous studies identified and characterized three class I KDACs in *Schistosoma mansoni*: HDAC 1, 3 and 8. Invalidation of the transcription of SmHDAC8 by RNAi led to the impaired survival of the worms after the infection of mice, showing that it is a valid therapeutic target. The analysis of the 3D structure of SmHDAC8 by X-ray crystallography showed that the catalytic domain structure diverges significantly from that of human HDAC8 and this was exploited to identify selective inhibitors that induce apoptosis and death of the worms and are thus lead compounds for the development of novel anti-schistosomal drugs.

The precise biological roles of mammalian or schistosomal HDAC8 are unknown and in order to determine why SmHDAC8 knockdown or inhibition causes apoptosis and death it is essential to study the cellular signaling pathways involving SmHDAC8. In the first part of the work described in this thesis, protein partners of SmHDAC8 were characterized by screening a yeast two-hybrid cDNA library and co-immunoprecipitation/mass spectrometry (MS) analysis. SmHDAC8 partners are involved in different processes, included transcriptional and translational regulation, cell cycle, metabolism, DNA repair, proteolysis or protein transport. Among the partners thus identified the schistosome orthologue of the human RhoAGTPase, suggesting that SmHDAC8 may be involved in the modulation of the organization of the cytoskeleton.

The second part of the work focused on the interaction between SmHDAC8 and SmRho1. In adult worms and schistosomula *S. mansoni*, SmHDAC8 interacts with SmRho1 GTPase which is acetylated on lysine K136. Treatment with an SmHDAC8 inhibitor caused massive disruption of the worm and schistosomula actin cytoskeleton. We have also identified two closely related isoforms of SmRho1 (SmRho1.1 and SmRho1.2). By using two heterologous expression systems (the yeast two hybrid assay and *Xenopus* oocytes), we have demonstrated a specific interaction between SmHDAC8 and SmRho1.1 involving its C-terminal moiety. Our results show that SmHDAC8 is potentially involved in cytoskeleton organization via its interaction with the SmRho1.1 isoform.

Table des matières

Liste des abréviations.....	2
Cadre de Travail.....	4
INTRODUCTION.....	5
PARTIE I : Schistosomes et schistosomiasés : généralités.....	5
A. Le schistosome.....	5
1- Un parasite très ancien ?.....	5
2- Systématique et phylogénie des schistosomes.....	6
3- Le cycle de vie du schistosome.....	9
❖ De l'œuf à la libération du miracidium.....	10
❖ Le miracidium : la larve infectante de l'hôte intermédiaire.....	12
❖ Le sporocyste: siège d'une intense multiplication asexuée.....	13
❖ Les cercaires.....	15
❖ Les schistosomules.....	16
❖ Le stade vers adulte.....	18
B. La schistosomiase.....	21
1- Données épidémiologiques.....	21
2- Physiopathologie.....	21
3- Manifestations cliniques.....	22
❖ Phase initiale de contamination.....	22
❖ Phase d'invasion ou phase toxémique.....	23
❖ Phase d'état.....	23
➤ La schistosomiase intestinale due à <i>S. intercalatum</i> et <i>S. mansoni</i>	23
➤ La schistosomiase uro-génitale induite pas <i>S. haematobium</i>	24
➤ La schistosomiase artério-veineuse provoquée par <i>S. japonicum</i> et <i>S. mekongi</i>	24
➤ La schistosomiase rectale due à <i>S. intercalatum</i> et <i>S. guineensis</i>	24
❖ Atteintes ectopiques.....	24
4- Les Co- infestations.....	26
❖ Interaction schistosomes- <i>Plasmodium falciparum</i>	26
❖ Interaction schistosomes-VIH.....	26
5- Méthodes de diagnostic.....	27
6- Traitement.....	28
❖ Le Praziquantel (PZQ) :.....	28
❖ Molécules alternatives au PZQ :.....	30
7- Prophylaxie.....	31

❖ Individuelle:	32
❖ Collective:.....	32
➤ Lutte contre la transmission	32
➤ Lutte contre le réservoir parasitaire.....	33
➤ Démarches et stratégies vaccinales	34
PARTIE II : Les lysines désacétylases.....	37
A. Généralités sur les KDACs.....	38
B. Les différentes classes de KDACs	40
1- Les KDACs Zn ²⁺ dépendantes.....	40
❖ La classe I	41
❖ La classe IIa et IIb :	43
❖ La classe IV :	44
2- Les KDACs NAD ⁺ dépendantes.....	45
C. Inhibiteurs de KDACs et thérapies anticancéreuses.....	48
D. Les KDACs chez les schistosomes.....	49
PARTIE III : L'histone désacétylase 8.....	52
A. Généralités	52
1- Structure.....	52
2- Mécanisme et régulation de l'activité d'HDAC8.....	53
3- Modification post-traductionnelles	54
B. Fonctions biologiques	55
C. Rôle d'HDAC8 dans la pathogenèse cancéreuse et les infections virales.....	58
D. L'Histone désacétylase 8 de <i>S. mansoni</i>	58
PARTIE IV : Les RhoGTPases.....	62
A. Généralités sur les RhoGTPases.....	62
1- Structure.....	63
2- Le cycle d'activation et sa régulation.....	65
❖ Les RhoGEFs, comme régulateurs positifs.....	66
❖ Les régulateurs négatifs.....	68
➤ Les RhoGAPs	68
➤ Les RhoGDIs.....	69
❖ Les effecteurs.....	71
➤ La formine mDia.....	71
➤ Les protéines ROCKs	73
➤ Les autres effecteurs de RhoA.....	75
3- Modifications post-traductionnelles	77

➤ La prénylation.....	77
➤ La phosphorylation.....	78
➤ La palmitoylation	78
➤ L'ubiquitination	79
➤ La transglutamination.....	79
➤ L'AMPylation	79
B. Fonctions biologiques	80
1- Les Rho GTPases dans la régulation de l'organisation du cytosquelette et fonctions associées.....	80
❖ Cytosquelette d'actine.....	80
❖ Réseaux microtubulaires.....	82
❖ Trafic vésiculaire	83
2- Le rôle des RhoGTPases dans la transcription et le cycle cellulaire	84
3- Les RhoGTPases et l'apoptose.....	86
C. Les RhoGTPases du schistosome.....	87
OBJECTIFS	89
RESULTATS	90
PARTIE I : Analyse de l'interactome de l'histone désacétylase 8 de <i>S. mansoni</i>.....	90
PARTIE II : Rôle de SmHDAC8 dans la regulation du cytosquelette : Caractérisation de l'interaction entre SmHDAC8 et la GTPase SmRho1	108
DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES	132
ANNEXE.....	140
BIBLIOGRPAHIE.....	146

Liste des abréviations

28-GST : Glutathione S-Transférase 28	KAT : Lysine Désacétylase
ACN : ACetoNitrile	JNK : c-Jun N-terminal Kinases
ACeCS : Acyl CoA Dehydrogenase	LIMK : LIM domain Kinase
ADP : Adénosine DiPhosphate	MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique	MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2
APC : Adenomatous Polyposis Coli	MEK : Dual specificity mitogen-activated protein Kinase
ATP : Adénosine TriPhosphate	MLC : Myosin Light Chain
BAD : Bcl2-Associated agonist of cell Death	MLCK : Myosin Light Chain Kinase
BAX : Bcl-2-Associated X	MPNST : Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors
BCR : Breakpoint Cluster Region protein	MRCK : Myotonic dystrophy-Related Cdc42-binding Kinases
BUZ : Binding of Ubiquitin Zinc	NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
CAMK : Ca ²⁺ /calModulin-dependent protein Kinase	NCOA3 : Nuclear receptor COactivator 3
CDC : Centers for Disease Control and Prevention	N-COR : Nuclear Receptor Co-Repressor
CLIP : Cytoplasmic Linker Protein	NES : Nuclear Export Signal
CPN : Copine	NF-κB : Nuclear Factor Kappa B
CRD : Cysteine-Rich Domain	NLS : Nuclear Localization Signal
CREB : Cyclic AMP-Responsive Element-Binding protein	NUP98 : Nuclear pore complex protein
CRIB : Cdc42- and Rac-Interactive Binding	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
CTCL : Cutaneous T-Cell Lymphoma	PAK : p21-Activated Kinase
DAD : Diaphanous Auto-inhibitory Domain	PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymerase
DHR : DOCK Homology Region	PCAF : P300-Associated Factor
DMPK : Dystrophia Myotonica Protein Kinase	PH : Pleckstrin Homology
EDTA : Éthylène Diamine TétraAcétique	PIP2 : Phosphatidyl Inositol-4,5-biPhosphate
EGFR : Epidermal Growth Factor	PIP3 : Phosphatidyl Inositol-3, 4,5-triPhosphate
EMA : European Medicines Agency	PKA : Proteine Kinase A
EMBP : Eosinophil Major Basic Protein	PKG : Proteine Kinase G
ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinases	PKN : Proteine Kinase N
FAK : Focal Adhesion Kinase	PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride
FDA : Food and Drug Administration	PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
FH : Formin Homology	PRC1 : Protein Regulating Cytokinesis 1
FoXO : ForkHead box O	PZQ : Praziquantel
GAP : GTPase-Activating Protein	RAI1 : Retinoic Acid-Induced protein 1
GEF : Guanine Exchange Factor	Ras : Rat sarcoma viral oncogene homolog
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique	RBD : Rho Binding Domain
GDP : Guanosine Diphosphate	Rho : Ras-homolog
GDH : Glutamate DésHydrogénase	RhoGDI : Rho Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor	ROCK : Rho-Associated Kinase
GTP : Guanosine TriPhosphate	ROS : Reactive Oxygen Species
GVBD : Germinal Vesicle BreakDown	SAHA : Suberoylanilide Hydroxamic Acid
HAD : HDAC Association Domain	SRF : Serum Response Factor
HAT : Histone Acetyl Transferase	SMRT : Nuclear Receptor corepressor
HDAC : Histone Désacétylase	SMC3 : Structural Maintenance of Chromosome 3
HME : Histone-Modifying Enzymes	SMMHN : Smooth Muscle Myosin Heavy Chain
HIV : Human Immunodeficiency Virus	SIR2 : Silence Information Regulator 2
HPV : Human PapillomaVirus	SIRT : Sirtuine
IFN : Interféron	SOS2 : Son of Sevenless
IQGAP : IQ motif containing GAP homolog	STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
KAC : Lysine Acetyl Transferase	

TCR : T Cell Receptor
THRAP : Thyroid Hormone Receptor-Associated Protein
TNF : Tumornecrosis factorToca : Transducer Of Cdc42-dependent actin Assembly
TSA : Trichostatine A
VPA : ValProic Acid
VSV : Vesicular Stomatitis Virus
WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE : WASP-family Verprolin-homologous Protein
WRN : Werner Syndrome ATP-dependent helicase
ZRANB2 : Zinc finger RAN-Binding domain-containing protein 2

Cadre de 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. Raymond J. Pierce dans l'équipe « Signalisation moléculaire et contrôle de la croissance et de la différenciation des parasites », dirigée par le Dr. Jamal Khalife puis dans l'équipe « Chemical Biology of Flatworms » dirigée par le Dr. Oleg Melnyk.

Le CIIL est une structure constituée de 14 équipes de recherches dont 1 équipe ATIP – Avenir. Les recherches effectuées au CIIL sont organisées en 3 axes majeurs : la biologie du pathogène, les stratégies d'infection, les réponses de l'hôte et les processus d'inflammation.

Dans ce contexte, notre groupe se focalise sur les mécanismes impliqués dans la régulation et le contrôle de l'expression des gènes chez le plathelminthe *Schistosoma mansoni*. Ces dernières années, dans le cadre des projets SEtTReND et A-ParaDDisE, financés par la Commission Européenne, nos recherches ont porté sur les enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles des protéines et plus précisément sur l'histone désacétylase 8 de *S. mansoni*.

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), le Dr. Christophe Romier (IGBMC, Département de Biologie Intégrative, INSERM U964, CNRS UMR 1704 - Université de Strasbourg) ainsi que le Dr. Jean Michel Saliou (Plateau Plateforme de Protéomique et Peptides Modifiés (P3M) - INSERM U1019 - CNRS UMR 8204 - Université de Lille - Institut Pasteur de Lille).

Leurs expertises respectives concernant l'utilisation du modèle d'ovocyte de xénope, la production de la protéine recombinante SmHDAC8, et les analyses effectuées en spectrométrie de masse ont été des atouts essentiels pour la réussite de ce travail de thèse.

Ce travail de recherche a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (36 mois).

INTRODUCTION

Schistosomes et schistosomiasis : généralités

La schistosomiase ou bilharziose est la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Elle est la plus importante helminthiase humaine en termes de mortalité et de morbidité puisqu'en 2016, 206,5 millions d'individus ont été infectés à travers le monde (<http://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/schistosomiasis>). Elle fait partie des 17 principales maladies tropicales négligées recensées par l'OMS et est avérée dans 78 pays situés essentiellement dans des régions tropicales et subtropicales du monde. La schistosomiase est une parasitose chronique due à un plathelminthe du genre *Schistosoma*. Différentes formes de la maladie sont retrouvées telles que la schistosomiase intestinale ou encore urinaire.

A. Le schistosome

1- Un parasite très ancien ?

Les postulats émis sur l'origine des schistosomes ont longtemps été basés sur les divers modèles de distribution géographique des vecteurs, réalisés grâce aux fossiles retrouvés à travers le monde. Jusqu'à l'avènement de la systématique moléculaire, il était suggéré que le genre *Schistosoma* serait apparu en Afrique, il y a 150 millions d'années. Des études phylogénétiques basées sur les séquences des ARNs ribosomiaux (18S) et de l'ADN mitochondrial codant le gène *cox1* ont néanmoins fourni un moyen d'élucider les déplacements historiques de ces parasites de l'Asie vers l'Afrique, il y a environ 1 à 4 millions d'années (*Lawton et al. 2011*). Toutefois, c'est vers 1550 avant J.C, dans l'antiquité égyptienne, que les premières données sur la schistosomiase furent répertoriées. Le papyrus médical d'Ebers, découvert par Edwin Smith en 1862 à Louxor dans la vallée du Nil, décrit une maladie principalement caractérisée par une hématurie. En 1851, Theodor Maximilian Bilharz, parasitologue allemand identifie l'agent pathogène responsable de la schistosomiase urinaire. Au cours des autopsies effectuées sur des patients hématuriques, il remarque des changements pathologiques constants au niveau des glandes séminales, de l'uretère et de la vessie. Il observe également des vers plats non segmentés, dans le plexus sanguin pelvien des malades et note la présence d'œufs à éperon terminal. Il attribue ces observations à un organisme parasite jusqu'alors inconnu et dénomme ce nouveau trématode : *Distomum haematobium*, appelé plus tard *Schistosoma haematobium*. En 1858, David Friedrich Weinland donnera à ce parasite le nom de « Schistosoma » (du grec schistos « séparé » et somas « corps ») sur la fausse impression que le trématode se présente « fendu en deux », nom qui sera officiellement accepté par la commission internationale de nomenclature zoologique en 1889.



Theodor
Maximilian
Bilharz
(1825-1862)



Sir Patrick
Manson
(1844-1922)

L'hypothèse de l'existence des différentes espèces de schistosome sera proposée par Patrick Manson ; en 1902, il décrit des cas de schistosomiase intestinale. Louis Westenra Sambon validera en 1907 cette hypothèse et nommera cette seconde espèce *Schistosoma mansoni*, pour le parasite produisant des œufs à éperon latéral. À la même période, *Schistosoma japonicum* est identifié et décrit par Fujiro Katsurada au Japon, et Robert Leiper établit le cycle de vie complet de *Schistosoma haematobium*. En 1910, Sir Marc Armand Ruffer, pionnier de la paléoparasitologie, met en évidence des œufs calcifiés à éperon terminal de *S. haematobium* dans le cortex rénal de momies égyptiennes datant de 1250 à 1000 ans avant JC. D'autres espèces comme *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi* et *Schistosoma guineensis* seront isolées respectivement en 1934, au Congo par Fisher, au Laos en 1978 (Ohmae et al. 2004) et en 2003 en République démocratique du Congo.

2- Systématique et phylogénie des schistosomes

La classification des différentes espèces de schistosome est fondée sur divers critères morphologiques et zoologiques. Elle s'établit de la façon suivante :

Règne	Animalia
Sous-règne	Bilateria
Infra-règne	Protostomia
Super- embranchement	Platyzoa
Embranchement	Platyhelminthes
Sous-embranchement	Neodermata
Classe	Trematoda
Sous-classe	Digenea
Ordre	Strigeatida
Famille	Schistosomatidae
Genre	Schistosoma

Les schistosomes sont des eumétazoaires (ou métazoaires supérieurs) (Figure 1), c'est-à-dire des animaux pluricellulaires hétérotrophes. Ils appartiennent au sous-règne des bilatériens et sont des organismes triploblastiques caractérisés par une symétrie bilatérale (présence des axes dorso-ventral, antéro-postérieur et medio-latéral) dont l'embryon est organisé en trois feuilletts embryonnaires : ectoderme, endoderme et mésoderme. Ce sont des protostomiens dont le blastopore deviendra l'orifice buccal lors du développement embryonnaire et ils ne possèdent pas de système circulatoire et respiratoire, ce sont donc par définition des platyzoaires. Les schistosomes sont des vers non segmentés, acœlomates, les plaçant ainsi dans le phylum des plathelminthes (Figure 1). Ils appartiennent au sous-phylum des *Neodermata* et à la classe des trématodes dont

les caractéristiques principales sont la présence d'un tégument syncytial et d'une ventouse orale et ventrale. Ils font également partie de la sous-classe des digènes puisqu'ils possèdent un cycle de vie comprenant deux hôtes distincts et deux stades larvaires libres. Ils entrent enfin dans la famille des *Schistosomatidea* puisqu'il s'agit d'espèces à sexes séparés où le mâle et la femelle sont morphologiquement différents.

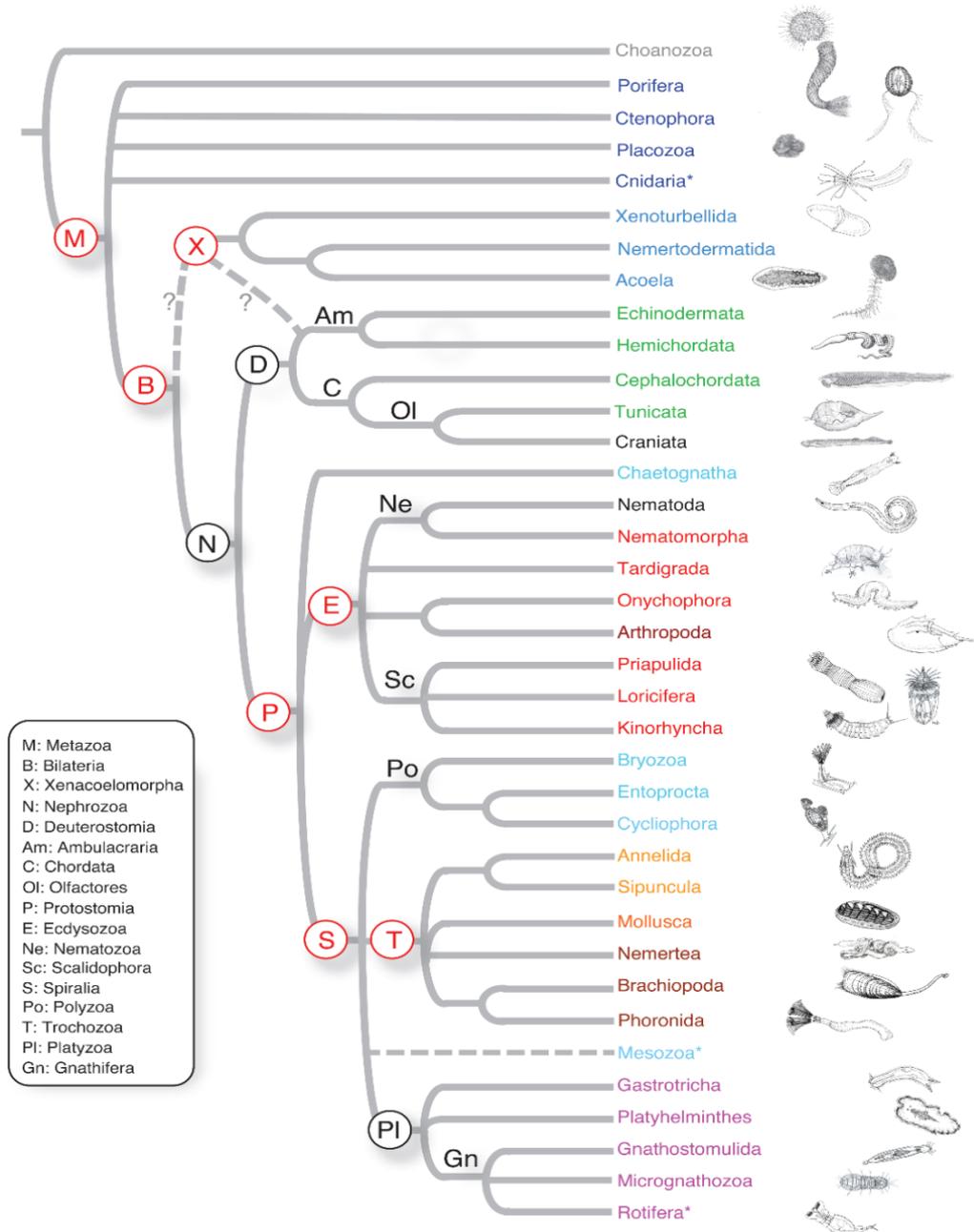


FIGURE 1 : Arbre phylogénétique simplifié des métazoaires (Lopez, 2014).

Le genre *Schistosoma* rassemble 23 espèces de parasites infestant essentiellement les mammifères (Homme, Primates, Ongulés, Carnivores, Rongeurs). Ces différents membres peuvent être subdivisés en quatre groupes en fonction de leurs localisations géographiques, de la morphologie de leurs œufs et du genre de l'hôte intermédiaire (Figure 2).

INTRODUCTION

Le groupe *S. mansoni* comprend deux espèces, *S. rodhaini* et *S. mansoni* seulement, dont l'hôte intermédiaire est un mollusque du genre *Biomphalaria*. Ces deux espèces sont capables d'infester divers hôtes définitifs tels que les primates ou encore les rongeurs (Figure 2). *S. rodhaini* est retrouvé exclusivement sur le continent africain. *S. mansoni* touche l'Afrique sub-saharienne mais également l'Amérique du Sud (Brésil, Venezuela), le Moyen-Orient et les Caraïbes. Les membres de ce groupe sont responsables de la schistosomiase intestinale et possèdent des œufs à éperon latéral.

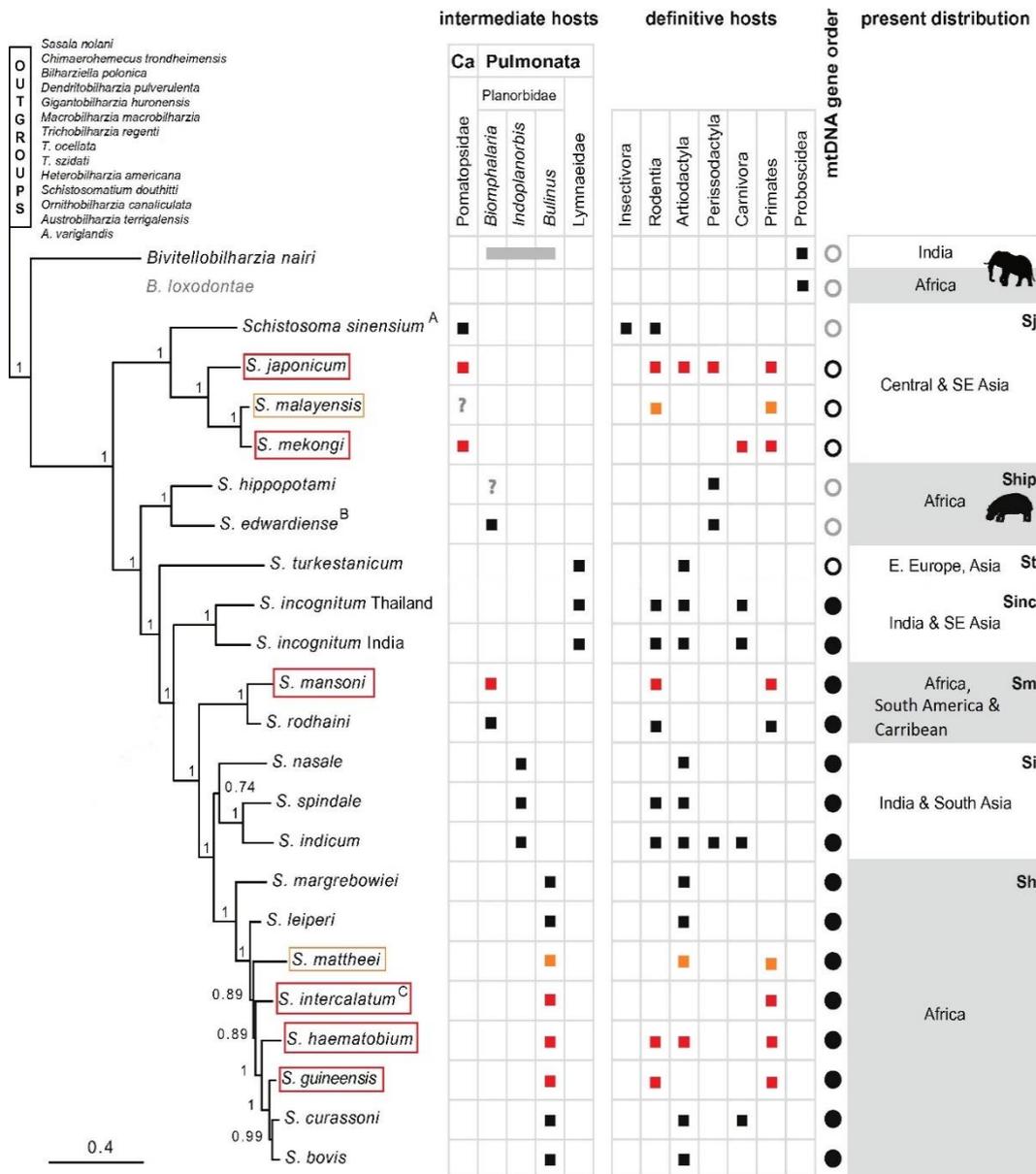


FIGURE 2 : Phylogénie du genre *Schistosoma*.

Arbre phylogénétique des différentes espèces de schistosomes basé sur l'analyse des séquences des ADNs ribosomiaux et de l'ADN mitochondrial codant Cox1 (d'après Webster et Littlewood, 2012). Les six espèces de schistosome infestant l'Homme sont encadrées en rouge. Les espèces *S. malayensis* et *S. mattheei* (encadrées en orange) sont retrouvées chez l'Homme dans des cas de contaminations accidentelles.

Le groupe *S. japonicum* est localisé essentiellement en Asie centrale et du Sud Est incluant la Chine, la Malaisie ainsi que les Philippines. Il regroupe les espèces *S. sinensium*, *S. mekongi*, *S. malayensis*, *S. japonicum* et *S.*

ovuncatum qui infestent respectivement les mollusques du genre *Oncomelania*, *Tricola* et *Robertsia*. Ces espèces peuvent être considérées comme zoonotiques car leurs hôtes définitifs sont également très variés : primates, carnivores, insectivores et les *Artiodactyla* (Figure 2).

Le groupe *S. haematobium* infeste les rongeurs et les primates (Figure 2). Les espèces impliquées sont les suivantes : *S. bovis*, *S. mattheei*, *S. curassoni*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* et *S. guineensis*. Ce groupe retrouvé chez les mollusques du genre *Bulinus*, touche exclusivement le continent africain et est caractérisé par des œufs à éperon terminal.

Le groupe *S. indicum* rassemble les espèces *S. nasale*, *S. spindal* et *S. indicum* qui sont présentes en Inde et en Asie du Sud. Il touche essentiellement les mollusques du genre *Indoplanorbis* et infeste les rongeurs, les carnivores, les *Artiodactyla* et les *Perissodactyla* (Figure 2).

Le groupe *S. hippopotami* comprend les espèces *S. edwardiense* et *S. hippopotami* qui infestent le mollusque du genre *Ceratophallus*. Il touche les gros mammifères tels que les éléphants et les hippopotames.

Seules 6 espèces sont néanmoins nuisibles pour l'Homme. Il s'agit de *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. guineensis* et *S. mekongi* (Figure 2).

3- Le cycle de vie du schistosome

Les schistosomes ont un cycle de vie dit hétéroxène où l'hôte intermédiaire est un mollusque d'eau douce et l'hôte définitif un mammifère. Au cours de la pénétration transcutanée de l'hôte définitif, la cercaire (ou furcocercaire), issue du mollusque, va subir des modifications morphologiques, biochimiques et se transformer en schistosomules. Les schistosomules vont ensuite quitter le derme de l'hôte définitif et rejoindre la circulation générale afin de subir une maturation morphologique et se différencier en schistosomes adultes mâles ou femelles. La maturité sexuelle des vers adultes sera atteinte dès lors que la femelle se logera dans le canal gynécophore du mâle. Le couple va par la suite migrer jusqu'aux veines mésentériques, dans les cas de *S. mansoni* et *S. japonicum* ou jusqu'au plexus veineux vésical pour *S. haematobium*, lieu de ponte des œufs. Une partie des œufs sera excrétée dans les organes creux et évacuée dans le milieu extérieur par les selles ou les urines ; quant aux autres, ils seront piégés dans les tissus. Au contact de l'eau, les œufs vont éclore, libérant la forme infestante de l'hôte intermédiaire appelée le miracidium. Après avoir infesté le mollusque, les miracidia vont se différencier en sporocystes puis par reproduction asexuée, ils vont se multiplier pour donner naissance à de nombreux furcocercaires. Ce sont les centaines d'œufs libérés quotidiennement par la femelle qui sont responsables des symptômes observés lors de la schistosomiase. En effet, les œufs piégés dans les tissus lors de la ponte vont déclencher une réponse immunitaire et inflammatoire accrue, provoquant la formation de granulomes bilharziens. Le cycle de vie du schistosome est donc complexe puisqu'il possède cinq stades parasitaires morphologiquement différents et deux hôtes successifs (Figure 3).

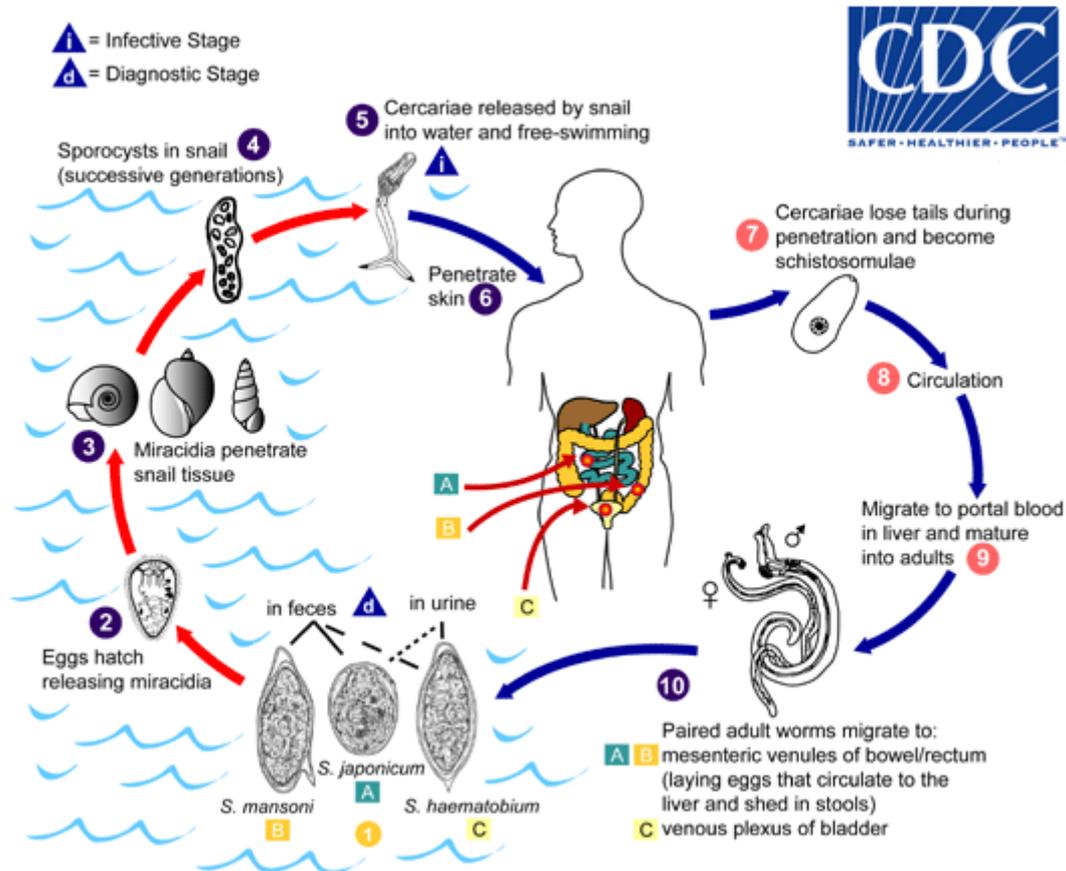


FIGURE 3 : Cycle de vie du schistosome (<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>)

❖ De l'œuf à la libération du miracidium

Comme nous avons pu le souligner précédemment (Cf : *Partie A-2 : Systématique et phylogénie des schistosomes*), il est possible de distinguer les différentes espèces de schistosome en fonction des caractéristiques morphologiques de leurs œufs (position de l'éperon et taille des œufs). Les œufs de *S. mansoni*, par exemple possèdent un éperon latéral, sont grands et ovales (115-175 x 45-70 µm) (Figure 4). Ceux de *S. haematobium* ont un éperon terminal et sont aussi grands et ovales (110-170 x 40-70 µm). Les œufs de *S. japonicum*, quant à eux sont plus petits (70-100 x 50-70 µm) et arrondis avec un éperon latéral (Figure 4).

Le processus de formation des œufs chez les trématodes et notamment chez les schistosomes est établi depuis la mise en évidence de leur biologie générale et de leur cycle de vie. L'embryogénèse chez le parasite se divise en 8 stades et dure environ 6 jours. Elle n'aura lieu qu'une fois l'œuf pondu dans l'organisme hôte. Avant cela, l'œuf se forme dans le ver femelle où l'ovocyte mature sera fécondé lors de son passage dans le réceptacle séminal (stade pré-embryonnaire). L'ovocyte fécondé ou zygote va ensuite traverser l'oviducte (stade 0 ou stade zygotique), où il va rencontrer et s'entourer de nombreuses cellules vitellines (30 à 40 pour *S. mansoni* et 16 à 30 pour les œufs de *S. japonicum*) provenant du canal vitellin. L'association zygote-cellules vitellines va alors migrer

le long de l'ootype où pourra alors se former la coquille, pour enfin se déplacer jusqu'à l'utérus avant d'être libéré dans l'organisme hôte par le pore génital de la femelle.

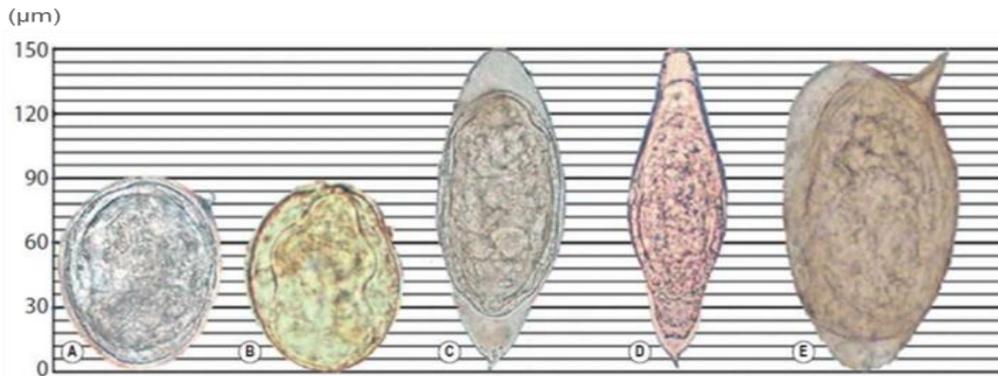


FIGURE 4 : Différences morphologiques des œufs de schistosome.

A : *S. japonicum*, B : *S. mekongi*, C : *S. haematobium*, D : *S. intercalatum*, E : *S. mansoni* (CDC).

La coquille est une structure solide d'environ 700 à 1000 nm d'épaisseur. Elle est caractérisée par la présence de multiples épines et pores (environ 100 nm de diamètre) visibles en microscopie électronique. De nombreuses études proposent d'ailleurs que ces structures soient impliquées dans la sécrétion des protéines ainsi que dans la prise en charge des nutriments présents chez l'hôte nécessaire au développement du miracidium (*Erasmus 1973 ; Stenger et al. 1967 ; Hockley 1968*). Cependant, aucune preuve fonctionnelle n'a encore été établie puisque ces travaux ne reposent que sur l'analyse de l'ultrastructure de l'œuf du parasite. Elle est composée majoritairement des protéines p14 (*Bobek et al. 1988*) et p48 dont les précurseurs sont contenus dans les granules de sécrétion des cellules vitellines. L'analyse du protéome de la coquille des œufs de *S. mansoni* a également montré qu'elle était constituée de nombreuses autres protéines telles que des chaperonnes (Hsp70), des protéines du métabolisme (ATP synthase), membranaires ou encore du cytosquelette (α et β - tubuline, actine) (*deWalick et al. 2011*).

La coquille se forme par un processus de réticulation des protéines appelé « quinone tanning » basé sur la conversion des acides aminés tyrosines en quinone, qui pourront réagir avec les substitués nucléophiles des résidus histidine ou lysine. Ce mécanisme est sous la dépendance de deux tyrosinases. En 2012, *He et al.* ont montré que l'inactivation par ARN interférence (ARNi) des transcrits codant pour les tyrosinases SjTYR1 et SjTYR2 de *S. japonicum* induisait des changements morphologiques évidents et une importante diminution du nombre d'œufs intra-utérins.

Les œufs des schistosomes sont responsables de la pathologie et bien qu'une partie d'entre eux soit libérée dans l'environnement, l'autre partie restera piégée dans les tissus de l'hôte. Néanmoins, l'éclosion de l'œuf et la libération du miracidium permettant de pérenniser le cycle de vie du parasite, ont lieu au contact avec l'eau douce et sont sous l'influence de multiples stimuli. Une étude réalisée chez *S. mansoni* a montré que l'utilisation d'antagonistes de la calmoduline (W-7) pouvait inhiber l'éclosion des œufs, mettant ainsi en évidence l'implication du complexe Ca^{2+} /Calmoduline dans ce processus. De plus, les leucines aminopeptidases LAP1 et LAP2 semblent également essentielles puisque l'inactivation de *SmLAP1* et *SmLAP2* par ARNi induit une

diminution de l'éclosion des œufs de 80%. D'autres facteurs tels que la pression osmotique, la température de l'eau et la lumière interviendraient aussi dans cette étape (Xu et Dresden 1990).

❖ Le miracidium : la larve infectante de l'hôte intermédiaire

Le miracidium est le stade parasite assurant le passage entre l'hôte définitif vertébré et l'hôte intermédiaire invertébré. C'est une larve nageuse mesurant approximativement 150-180 µm de long et 70-80 µm de large recouverte de plaques ciliées (Figure 5A et B) lui permettant de nager à 2 mm.s⁻¹ sur une distance d'environ 5 mètres. Elle est formée d'une masse neurale entourée de ganglions périphériques, d'un système d'excrétion utilisant des cellules flammes ainsi que d'un sac digestif peu développé (Figure 5C). Les miracidia possèdent également une vingtaine de cellules germinales, un système de sécrétion comprenant plusieurs glandes et un organe impliqué dans l'attachement et la pénétration de la larve dans son hôte aussi appelé le térébratorium (Figure 5B et C).

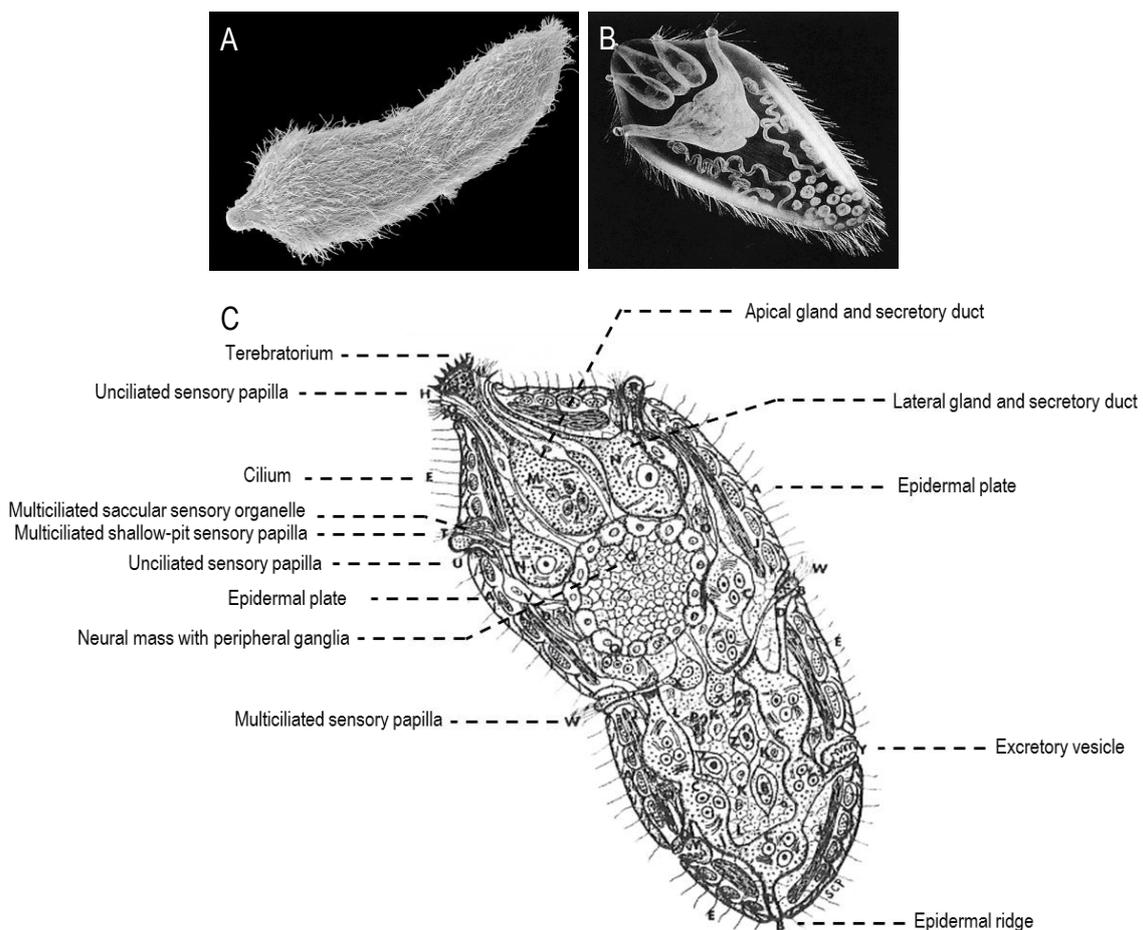


FIGURE 5 : Le miracidium.

A- Observation au microscope électronique à balayage d'un miracidium. **B-** Observation au microscope électronique à balayage des différentes structures composant la larve ciliée. **C-** Schéma annoté d'un miracidium (d'après Basch 1991).

L'hôte du miracidium est un mollusque d'eau douce dont le genre semble être spécifique de l'espèce de schistosome. Les différents mécanismes par lesquels le parasite va détecter et reconnaître son hôte dépendent des nombreux stimuli externes physico-chimiques (géotropisme, phototropisme et chimiotactisme). Ainsi, les miracidia de *S. mansoni* possèdent, par exemple un géotropisme négatif et un phototropisme positif, leurs permettant ainsi de nager jusqu'à la surface de l'eau, vers leur hôte *B. glabrata*. Au contraire, *S. haematobium* se caractérisera plutôt par un tropisme radicalement inverse où les mollusques du genre *Bulinus* sont localisés principalement en profondeur, à des endroits peu éclairés (Prah et James 1977). L'espérance de vie du miracidium étant très faible (8 à 12 heures), il est donc nécessaire pour lui de trouver rapidement son hôte. Il s'en suit alors une étape de fixation au niveau du pied du mollusque (dans 70% des cas) ou des tentacules, faisant intervenir le terebratorium (ou papille apicale) (Figure 5C). Par l'association de mouvements mécaniques et de sécrétion d'enzymes par les glandes céphaliques, le parasite va pénétrer sa cible à travers son tégument induisant d'importantes transformations physiologiques, morphologiques et métaboliques.

❖ Le sporocyste : siège d'une intense multiplication asexuée

Deux heures après la pénétration dans le mollusque, le miracidium va perdre ses plaques ciliées. Ce processus fait intervenir les différentes structures tégumentaires du parasite et va aboutir à la formation d'un nouveau tégument syncial (Figure 6).

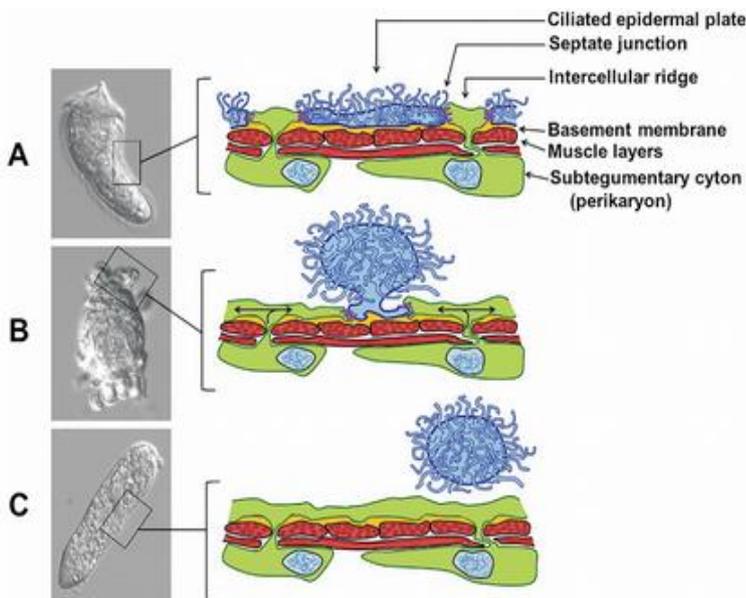


FIGURE 6 : Représentation schématique du mécanisme de transformation du miracidium en sporocyste (d'après Barrie 2016). A- Anatomie de la surface tégumentaire du miracidium avant son entrée dans le mollusque : Les crêtes intracellulaires sont attachées aux plaques ciliées par des jonctions serrées. B- Pendant la transformation, l'expansion des crêtes intracellulaires force les plaques ciliées à se regrouper. C-Tégument syncial du sporocyste résultant de la fusion des crêtes intracellulaires et de l'élimination des plaques ciliées.

Dans les 24 à 48h suivantes, de nombreux organes tels que les papilles sensorielles, le terebratorium ou encore la masse neurale vont dégénérer aboutissant à la formation du sporocyste primaire (ou sporocyste mère) (Figure 7).

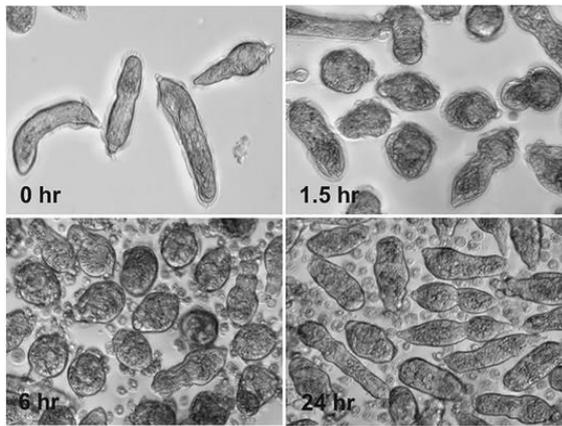


FIGURE 7 : Transformation *in vitro* de miracidium de *S. mansoni* en sporocystes primaires (Barrie and Jamieson. 2016). 0hr : miracidium nouvellement éclos. 1,5 hr : expansion des crêtes intracellulaires. 6hr : les miracidia ont perdu leurs plaques ciliées. 24hr : sporocystes complètement transformés.

Les sporocystes primaires de *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum* se développent généralement près du point d'entrée du miracidium tandis que chez *S. japonicum*, cette transformation aura lieu en profondeur, à proximité des organes creux du mollusque. Au niveau moléculaire, le processus de transformation du miracidium en sporocyste semble faire intervenir l'AMPc et le Ca^{2+} . En effet, Kawamoto *et al.* (1989) ont montré, par l'utilisation de divers composés chimiques (activateurs et inhibiteurs des voies AMPc et Ca^{2+} -dépendante), que l'augmentation des taux cytosoliques de Ca^{2+} et la diminution de l'AMPc semblaient favoriser cette transformation. En 2011, Taft *et al.* ont également démontré que ce processus était plus particulièrement sous la dépendance de l'activité de l'adénylate cyclase. Le sporocyste primaire va ensuite s'allonger, les cellules germinales vont se multiplier, pour donner naissance à de multiples sporocystes secondaires (ou sporocystes filles) (Figure 8). Ceux-ci vont alors migrer jusqu'à l'hétopancreas *via* l'hémolymphe (migration passive) ou en passant à travers le tissu conjonctif (migration active), où ils pourront poursuivre leur croissance et leur développement. À noter que les sporocystes filles sont essentiellement constituées de cellules germinales (50 à 100 cellules) qui pourront soit produire de nouvelles sporocystes filles, soit se différencier en cercaire (Figure 8).

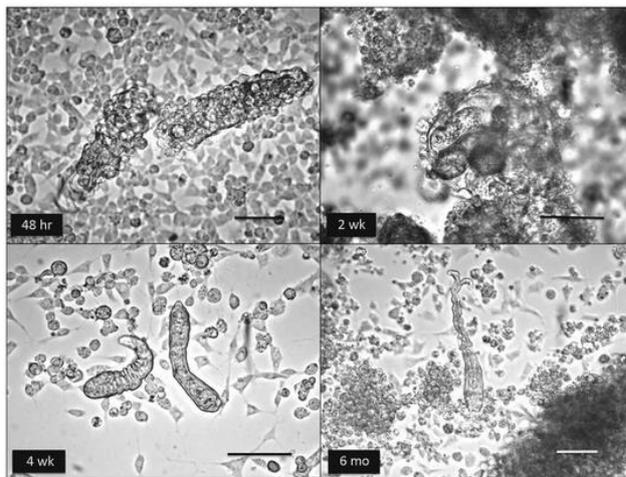


FIGURE 8 : Co-culture de sporocystes primaires de *S. mansoni* et de cellules Bge (*Biomphalaria glabrata* embryonic cell line) (Yoshino *et al.* 2013). 48hr-2wk : Sporocystes primaires encapsulés par les cellules Bge. 4wk : sporocystes secondaires. 6mo : après une co-culture prolongée de 6 à 9 mois, des cercaires peuvent émerger des sporocystes.

Une fois arrivés à maturité, les cercaires vont quitter le mollusque en lysant les tissus. L'émission des cercaires commence 3 semaines à 2 mois après l'infestation et peut durer de 3 mois à 3 ans en fonction de l'espèce de l'hôte. Elle est également sous le contrôle de deux paramètres ; la lumière (périodes ensoleillées de la journée) et la chaleur correspondant aux heures de fortes fréquentations des points d'eau (travaux domestiques,

baignades...). Le nombre de cercaires émises peut dans certains cas atteindre 15 000 par jour, et dépend de l'intensité de l'infestation et de la taille du gastéropode.

❖ Les cercaires

La cercaire ou furcocercaire est le stade infestant pour l'hôte définitif vertébré. C'est une larve composée d'un corps de 125 µm de long et d'une queue bifide de 200 µm lui permettant de nager de manière active en eau douce (*Figure 9A et B*). Au niveau morphologique, la cercaire possède un tégument syncicial recouvert d'une couche de glycocalyx de 1 à 2 µm d'épaisseur jouant un rôle protecteur contre l'environnement hypo-osmotique qu'elle rencontrera lors de son passage de l'hôte invertébré à l'hôte vertébré. Le tégument de la cercaire se caractérise également par la présence de multiples microspines et récepteurs sensoriels (photo, mécano et chémorécepteurs) impliqués dans la localisation et l'infestation de l'hôte. Elle dispose d'une masse neurale, d'un système digestif et reproducteur peu développé et non fonctionnel ainsi qu'un système d'excrétion composé de cellules flammes. Différentes glandes impliquées dans la pénétration sont retrouvées : les glandes pré- et post-acétabulaire (*Figure 9C*). Mentionnons également que les caractéristiques morphologiques de ce stade parasite sont identiques chez les larves mâles et femelles, ne permettant donc pas de les discerner.

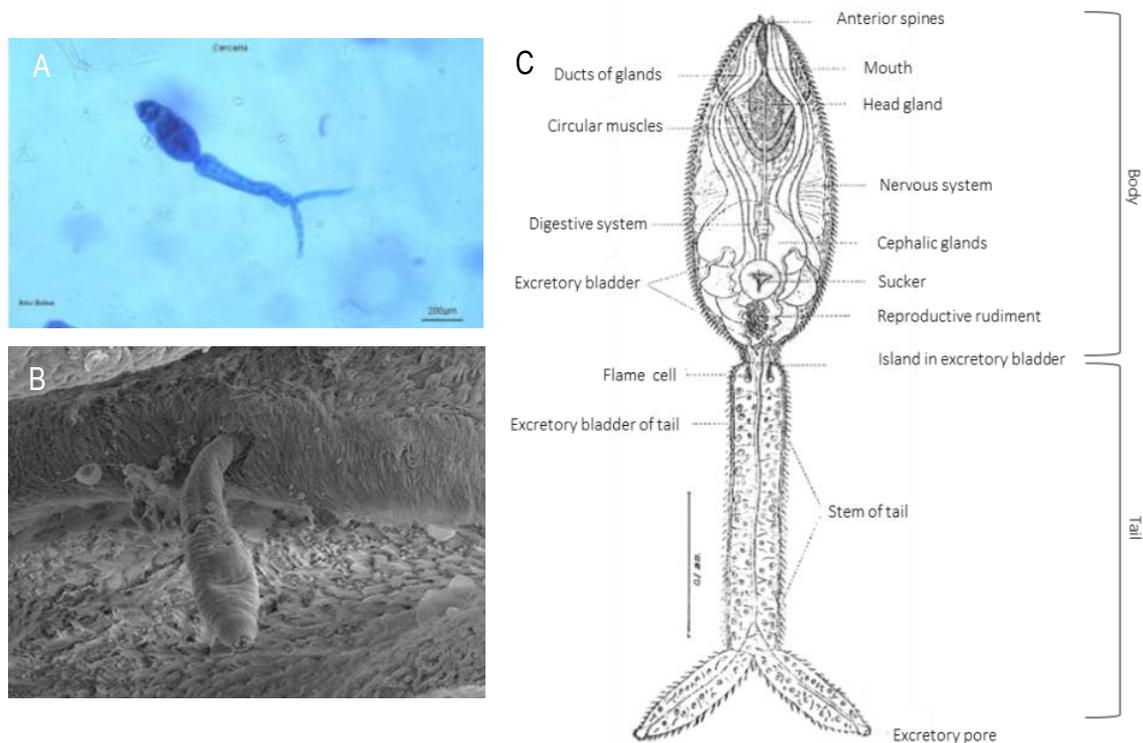


FIGURE 9 : La cercaire

A- Photographie d'une cercaire de *S. mansoni* en train de nager. **B-** Cercaire de *S. mansoni* émergeant du mollusque observée en microscopie électronique. **C-** Schéma annoté de la cercaire (*d'après Basch 1991*).

INTRODUCTION

La durée de vie dans l'eau d'une cercaire ne dépassant pas 48 heures, sa longévité et sa capacité à infester son hôte dépend de ses réserves énergétiques (glycogène), des conditions environnementales et des signaux émis par l'hôte vertébré. Grâce à de multiples facteurs abiotiques tels que la gravité, la lumière et la température, les cercaires ont tendance à se concentrer à la surface de l'eau afin d'assurer la rencontre avec leurs cibles. Elles sont également attirées par un chimiotactisme important lié aux sécrétions cutanées de l'hôte (acides gras libre, L-arginine, petits peptides possédant une L-arginine en position terminales) (Haeberlein et Haas 2008).

La pénétration de la cercaire est un mécanisme rapide (quelques minutes) et actif, facilité par la sécrétion d'enzymes protéolytiques (sérine et cystéine protéases) contenues dans ses glandes acétabulaires (Ingram et al. 2012 ; Dalton et al. 1997 ; Salter et al. 2000).

La transformation de la cercaire en schistosomule est une étape cruciale du cycle de vie du parasite. Ce processus dure entre 3 et 6h et s'accompagne d'importants changements physiologiques et structuraux :

- Perte de la queue (Howells et Gazzinelli 1974) (Figure 10A).
- Perte du glycocalyx et formation de microvillosités (Stirewalt et al. 1983).
- Formation d'un nouveau tégument heptalaminé (Hockley et McLaren 1973).
- Perte des glandes pré-acétabulaires (Gazzinelli et al. 1973).
- Changement d'un métabolisme aérobie vers la glycolyse anaérobie (Horemans et al. 1992).
- Mise en place de mécanismes de défense face au système immunitaire de l'hôte (Wiest et al. 1988).

À l'issue de ces différentes étapes, un nouveau stade parasitaire est observé, on parlera alors de schistosomules.

❖ Les schistosomules

Le stade schistosomule est le stade juvénile et migratoire du parasite et c'est au cours de son parcours dans l'organisme hôte, que les principaux changements morphologiques et biochimiques aboutissant au stade adulte, vont s'établir. Au cours des 24h qui suivent l'infestation, environ 90% des schistosomules notamment pour *S. mansoni* et *S. haematobium*, sont présents encore dans l'épiderme. Dans le cas de *S. japonicum*, le profil de migration est bien différent, puisque les parasites auront rejoint le derme dans les 24h post-infestation (He et al. 2012). Que ce soit par les capillaires dermiques ou bien par les vaisseaux lymphatiques, les schistosomules vont traverser la lame basale de l'épiderme afin de rejoindre la circulation générale (Figure 10C). À ce stade, les ventouses ventrales et orales sont déjà visibles et les parasites commencent à s'allonger. Ils sont ensuite transportés passivement à travers le cœur droit vers les capillaires pulmonaires, où ils seront piégés temporairement. Cette étape a lieu 2 jours après l'infestation pour *S. japonicum*, et 5 jours pour *S. mansoni*.

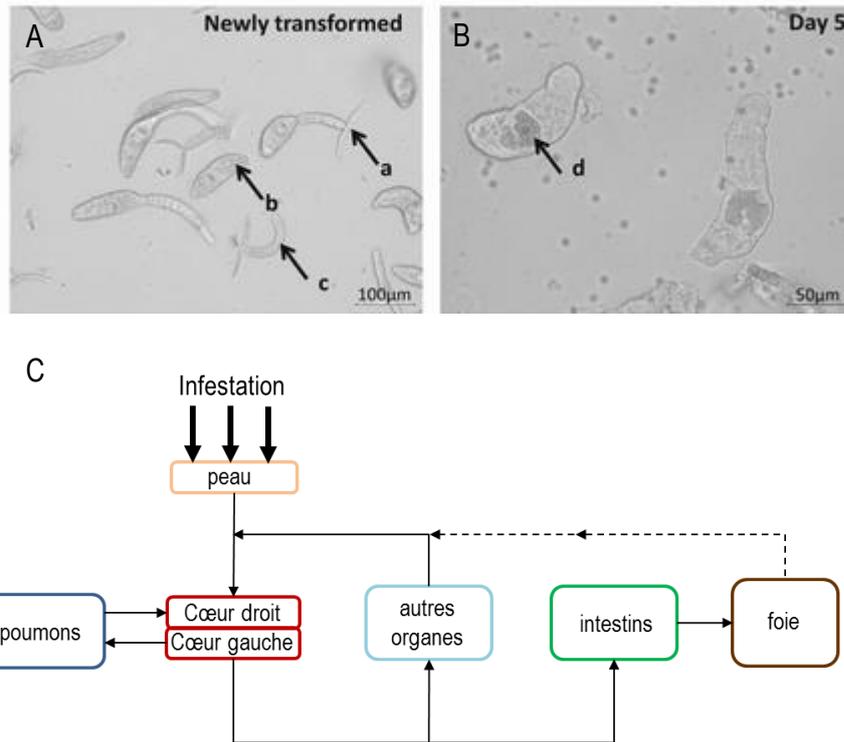


FIGURE 10 : Le stade schistosomule.

A et B- Schistosomules obtenus par transformation mécanique des cercaires (d'après Barrie et Jamieson 2016). a : cercaires, b : schistosomules, c : queue de cercaire, d : caecum. **C-** Parcours migratoire effectué par le schistosomule au sein de son hôte définitif.

Une première phase de maturation de 3 et 4 jours a lieu dans les poumons. Le corps du parasite va continuer de s'allonger jusqu'à ce qu'il puisse se déplacer activement à travers les capillaires pulmonaires (Figure 10C). Les schistosomules seront alors une nouvelle fois transportés passivement par le sang à travers le cœur gauche, dans la circulation systémique pour enfin atteindre le foie et le système porte, où ils subiront une seconde étape de maturation (Figure 10C). La phase hépatique dure entre 8 et 10 jours et c'est au niveau du foie que le parasite va subir des changements morphologiques et biochimiques essentiels à la formation du vers adulte. Les parasites vont progressivement acquérir leur dimorphisme sexuel. L'ingestion des érythrocytes commence à mesure que l'œsophage se développe. Les appareils reproducteurs et excréteurs vont croître. Le tégument sera également plus rigide et de nouvelles terminaisons nerveuses sensorielles apparaîtront.

Environ 28 à 35 jours après l'infestation, les schistosomes vont se différencier en vers adultes mâle ou femelle, s'accoupler puis migrer vers les veines mésentériques. *S. japonicum* sera retrouvé au niveau des branches antérieures des veines mésentériques supérieures. À l'inverse, *S. mansoni* se dirigera plutôt vers les branches postérieures des veines mésentériques supérieures et inférieures, alors que *S. haematobium* s'orientera vers le plexus vésical (Faust et al. 1934).

❖ Le stade vers adulte

Les schistosomes sont des espèces atypiques caractérisées par un dimorphisme sexuel marqué. En effet, les vers mâles mesurent 10 à 12 mm de long, ils sont trapus, recourbés et forment une gouttière couverte d'épines irrégulières appelée canal gynécophore (Machado-silva et al. 1997) (Figure 11B et C). Ils possèdent également des ventouses ventrales (ou acétabulum) et orales très développées, leur permettant de s'ancrer efficacement à l'endothélium vasculaire (Figure 11A et D). Les femelles à l'inverse sont plus fines et longues (12 à 16 mm), elles sont opaques dû à la présence d'hémozoïne dans leur tube digestif. Elles possèdent aussi des ventouses ventrales et orales mais beaucoup moins développées, et vont venir se loger dans le canal gynécophore formé par le mâle (Figure 11A et D). En 1990, Basch propose par ailleurs que ce dimorphisme sexuel serait le fruit d'une adaptation fonctionnelle au système circulatoire de l'hôte où la musculature du mâle permettrait au couple de se déplacer dans le plexus mésentérique ou vésical, à contre sens du flux et transporter la femelle vers le site de ponte.

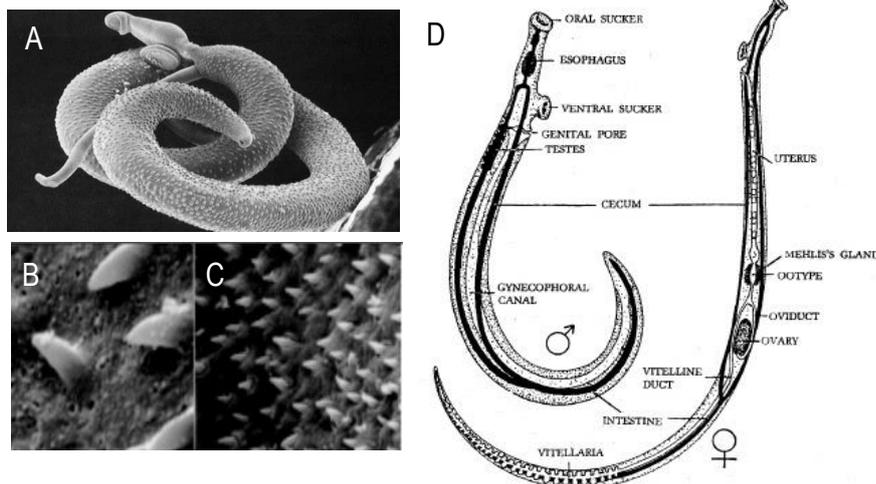


FIGURE 11 : Les vers adultes

A- Photographie d'un couple de vers adultes prise en microscopie confocale à balayage (banque d'images de l'équipe CBF). **B et C-** Photographies de la partie médiane du canal gynécophore d'un vers mâle de *S. mansoni* réalisées en microscopie électronique à balayage. De nombreuses microspines sont observées (Machado-silva, et al.1997). **D-** Schéma annoté d'un couple de vers adultes de schistosome (Basch 1991).

Le tégument des schistosomes est une structure particulièrement complexe possédant de multiples fonctions sensorielles mais également impliqué dans l'excretion, l'osmorégulation ainsi que la protection contre le système immunitaire de l'hôte. Il est formé par un complexe membranaire multilaminé formant de profondes invaginations d'où peuvent émerger de petites vésicules d'endocytose (Kusel et al. 2007) (Figure 12D). On retrouve également des récepteurs sensoriels non ciliés connectés par des hemidesmosomes ainsi que de nombreuses épines et tubercules (Figures 12A, B et C). Le cytoplasme tégumentaire est séparé de la couche musculaire sous-jacente par une membrane basale et renferme de nombreuses mitochondries. Bien que des structures microtubulaires soient observées, le composant majoritaire du cytosquelette tégumentaire est l'actine, souvent associé à la dynéine ou à la myosine. En 1990, MacGregor et Shore ont aussi mis en évidence la présence de tropomyosine et d' α -actinine en association avec l'actine (Figure 12D).

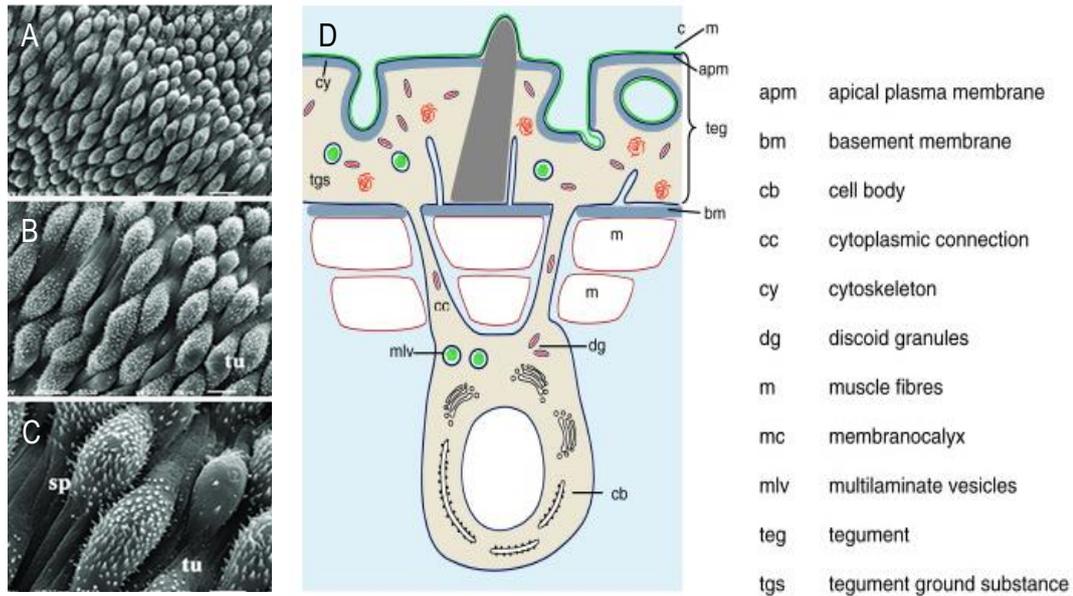


FIGURE 12 : Tégument du ver adulte.

A, B et C- tégument de ver adulte de *S. mansoni* observé en microscopie électronique montrant les multiples tubercules (tu) et microspines (sp), à différents grossissements (A : x 600. B : x 1200 et C : x 3000) (Morais et al. 2017). **D-** Représentation schématique des structures tégumentaires du vers adulte (Skelly et Wilson 2006).

L'appareil reproducteur du mâle se compose d'une série de lobes testiculaires (4 à 8 lobes), situés entre le caecum et l'acétabulum (Figure 13A et B). La région ventrale médiane de chaque testicule comporte un court canal efférent débouchant sur le vas deferens qui conduit à la vésicule séminale, lieu de stockage des spermatozoïdes matures (Figure 13A). L'évacuation des spermatozoïdes a lieu par le canal éjaculateur puis le cirrus situé dans le canal gynécophore à proximité du pore génital de la femelle.

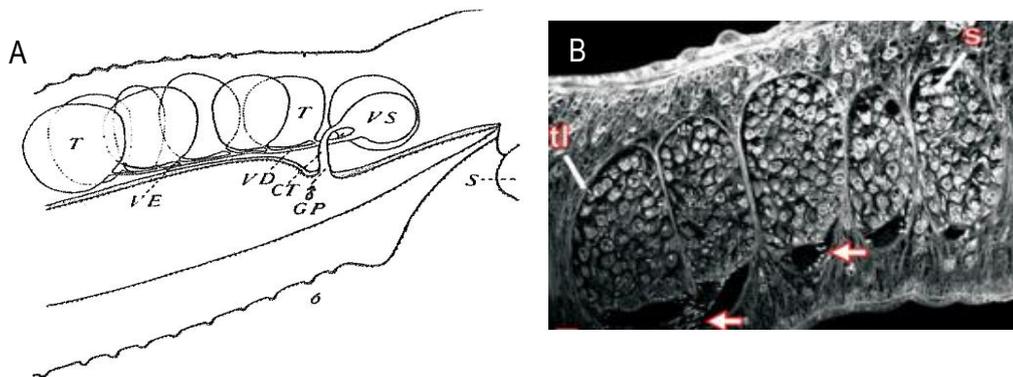


FIGURE 13 : Structure de l'appareil reproducteur du ver mâle.

A- Représentation schématique de l'appareil reproducteur mâle de *S. mansoni*. CT : cirrus tube ; GP : genital pore ; S : ventral sucker ; T : testis ; VD : vas deferens ; VE : vas efferens ; VS : seminal vesicle (Faust et al. 1934). **B-** Lobes testiculaires (tl) et vésicule séminale (S) pleine de spermatozoïdes différenciés observés en microscopie confocale à balayage laser (Beckmann et al. 2010).

Contrairement aux autres trématodes, l'appareil reproducteur de la femelle est composé d'un unique ovaire qui occupe environ 2/3 du corps de la femelle. Il comprend également d'autres organes tels que le pore génital, l'utérus, l'ootype qui accueille la glande de Mehlis, l'oviducte, le réceptacle séminal et les glandes vitellines (Figure 14A).

Les glandes vitellines ou vitellarium se composent de follicules vitellins reliés au vitelloducte. Chacun d'entre eux contient de multiples cellules vitellines ou vitellocytes présents à des stades de maturation différents.

Les cellules vitellines de stade 1 sont de petite taille avec un noyau imposant situé du côté lobé des follicules. Les vitellocytes de stade 2 voient leur cytoplasme se développer et commencent une activité de synthèse protéique alors que les cellules de stade 3 posséderont en plus un appareil de Golgi. Les cellules vitellines les plus matures (stade 4) sont les plus proximales par rapport au vitelloducte et sont caractérisées par la présence de complexes ribosomiaux. Rappelons que les cellules vitellines matures ont un rôle dans la formation de la coquille de l'oeuf et dans la nutrition de l'embryon du fait de la présence de nombreuses vésicules de sécrétion et de gouttelette lipidiques.

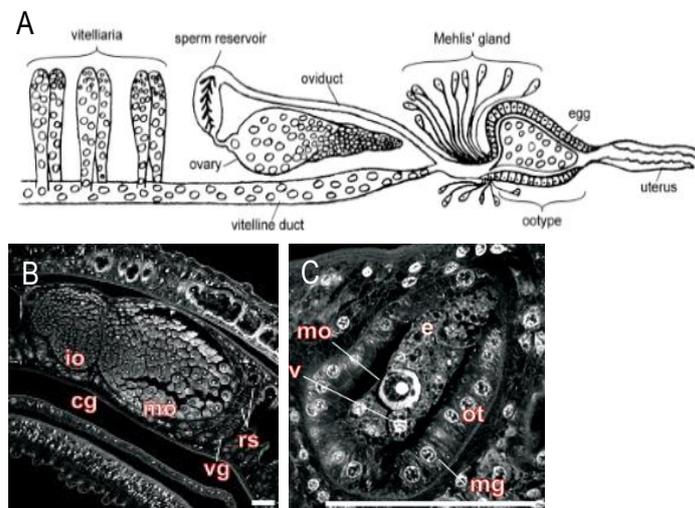


FIGURE 14 : Structure de l'appareil reproducteur du schistosome femelle. A- Schéma annoté de l'appareil reproducteur femelle (deWalick et al. 2012). B- Ovaire contenant des ovocytes matures et des ovocytes immatures, observés en microscopie confocale à balayage laser (Beckmann et al. 2010). C- Ootype renfermant un œuf en formation observé en microscopie confocale à balayage laser (Beckmann et al. 2010). (Abréviations : cg : canal gynécophore ; e : œuf ; mo : ovocyte mature ; mg : glande de Mehlis ; io : ovocyte immature ; ot : ootype ; rs : réceptacle séminal ; v : cellules vitellines ; vg : glande vitelline).

L'ovaire renferme également de nombreuses cellules à différents stades de maturation (Figure 14B). Les ovocytes immatures sont de petites cellules hexagonales et irrégulières, retrouvées au niveau de la région antérieure de l'organe avec un noyau central. Les ovocytes matures sont des cellules de taille plus importante qui sont retrouvées dans la partie postérieure de l'ovaire et prêts à être fécondés (Figure 14C). Après l'ovulation, l'ovocyte mature va remonter l'oviducte en traversant le réceptacle séminal. C'est ici que se regroupent les spermatozoïdes matures en provenance du canal gynécophore, après avoir remonté le tractus génital. La fécondation aura lieu dans la partie distale de l'oviducte, peu avant l'ootype. Arrivées à maturité, les femelles vont alors pouvoir pondre leurs œufs. Chez *S. haematobium*, la quantité d'œufs pondus par la femelle est estimée à 150 par jour et celles-ci sont capables de pondre toutes les 10 minutes. La quantité et la fréquence de ponte de *S. mansoni* est bien plus conséquente puisque les femelles pondent toutes les 5 minutes, ce qui représente environ 300 œufs par jour. Dans le cas de *S. japonicum*, 1500 œufs environ sont pondus chaque jour par la femelle. Fait intéressant, la maturation sexuelle de la femelle semble dépendante de l'accouplement. En effet, l'appariement est essentiel à la production d'œufs viables et au développement de l'ovaire et du vitellarium. Les changements induits par l'accouplement sont néanmoins réversibles puisque la formation de l'œuf peut s'arrêter et la femelle regresser vers un état immature. Ces mécanismes peuvent être de nouveau initiés lors d'un ré-appariement incluant le contrôle de l'activité transcriptionnelle de gènes exprimés spécifiquement chez la femelle (Kunz et al. 1995 ; Grevelding et al. 1997).

B. La schistosomiase

1- Données épidémiologiques

Les schistosomoses sont endémiques dans 76 pays tropicaux et subtropicaux (*Figure 15*). Elles touchent notamment des populations démunies où les systèmes sanitaires sont sommaires. En 2016, l’OMS estime que 206,5 millions de personnes ont eu besoin d’un traitement préventif contre la schistosomiase et plus de 88 millions d’entre elles ont été traitées (<http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>). Si des continents comme l’Asie ou encore l’Amérique du Sud sont touchés, 92 % des personnes qui ont besoin d’un traitement contre ces parasitoses vivent en Afrique. Un dispositif de surveillance de la schistosomiase existe également en France puisqu’en 2014 un foyer de transmission de la schistosomiase urinaire a été mis en évidence en Corse du sud (*Boissier et al. 2015*). En 2015, *Moné et al.* ont d’ailleurs démontré que la schistosomiase corse serait causée par une espèce de schistosome hybride entre *S. haematobium* et *S. bovis*. La stratégie de l’OMS pour lutter contre les schistosomoses se focalise sur la réduction du nombre de malades, aux moyens de traitements périodiques à grande échelle. Elle se concentre aussi sur l’amélioration de l’assainissement de l’eau potable ainsi que sur la lutte contre les vecteurs.

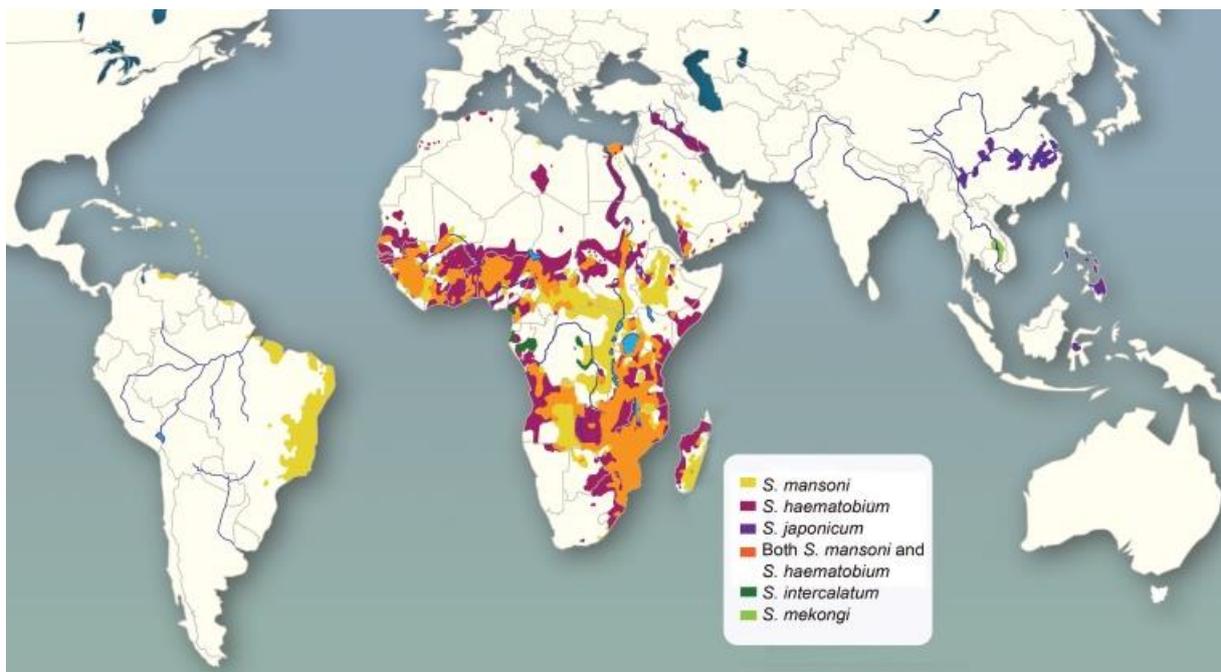


FIGURE 15 : Aire de distribution des Schistosomoses humaines (*Weerakoon et al. 2015*).

2- Physiopathologie

Hormis l’action irritante des cercaires pénétrant la peau et les réactions immunologiques d’hypersensibilités induites par la migration des schistosomules et des vers adultes, la pathologie est essentiellement liée à l’embolisation des œufs dans le foie et la rate, et à la réaction inflammatoire associée

(Figure 16). En effet, une partie des œufs va traverser les épithéliums des parois vasculaires et des organes creux sous-jacents provoquant des microsaignements. L'autre partie restera bloquée dans les tissus et sera à l'origine d'une réaction inflammatoire importante : le granulome bilharzien. Le granulome est une structure fibreuse constituée de fibroblastes, de macrophages et d'éosinophiles, recrutés par les cytokines sécrétées par les lymphocytes auxiliaires Th1 et Th2 activés (Pearce et Macdonald 2002).

La réponse de type Th1 va permettre de moduler les effets toxiques sur le foie induits par les œufs, en libérant de l'interféron γ (IFN- γ), du tumornecrosis factor α (TNF- α) et de l'oxyde nitrique (provenant des macrophages et des cellules endothéliales vasculaires). La réponse de type Th2 va stimuler la production de collagène par les fibroblastes participant à la formation du granulome en produisant de l'interleukine 13 (IL13). Les éosinophiles jouent un rôle dans la modulation de cette réponse immunitaire grâce aux multiples cytokines sécrétées, telles que l'IL2, IL4, IL5, IL10 et IFN- γ et au EMBP (Eosinophil Major Basic Protein) qui auront une cytotoxicité directe sur les œufs (Kephart et al. 1988).

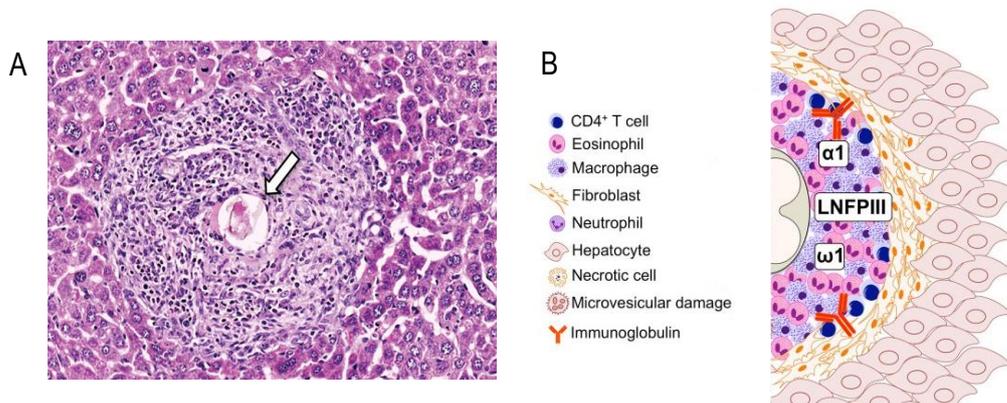


FIGURE 16 : Composition du granulome bilharzien.

A- Coupe histologique de foie provenant d'un individu infesté par *S. mansoni* et présentant un œuf au centre, entouré par des cellules immunitaires (Hams et al. 2013). B- Représentation schématique illustrant les différents types cellulaires présents au sein d'un granulome bilharzien (Hams et al. 2013).

3- Manifestations cliniques

Les différentes manifestations cliniques induites par la pathologie évoluent classiquement en trois phases correspondant aux différents stades évolutifs du parasite chez l'Homme :

❖ Phase initiale de contamination

Cette phase correspond à la pénétration des cercaires chez l'hôte et se traduit cliniquement par une éruption prurigineuse localisée au niveau de la zone de la peau traversée par le parasite ; environ 15 à 30 minutes après le bain infestant, les enzymes sécrétées par les cercaires vont provoquer de multiples lésions cutanées (ou

érythème cutané allergique) localisées majoritairement au niveau des membres inférieurs et des mains. Les populations vivant en zones endémiques ne seront que faiblement sujettes à ce type de symptômes puisqu'ils ont tendance à s'atténuer avec le nombre croissant d'infestation voir passer complètement inaperçus. La dermatite cercarienne se manifeste donc essentiellement lors d'une primo-infection.

Cette première phase sera également d'intensité variable en fonction de l'espèce de schistosome.

❖ Phase d'invasion ou phase toxémique

Cette deuxième phase de développement de la pathologie est liée à la migration des schistosomules dans l'organisme et leurs maturations en vers adultes. Elle se produit généralement entre 14 et 84 jours après l'infestation (*Ross et al. 2007*). Les différentes manifestations cliniques observées sont liées à une réaction immuno-allergique provoquée par la présence des parasites dans la circulation sanguine. Regroupés sous le terme de fièvre de Katayama, les symptômes sont les suivants : douleurs abdominales, anorexie, diarrhées, prurit, poussée d'urticaire, fièvre. Il est aussi possible de retrouver chez certains patients une dégradation de l'état général caractérisé par un amaigrissement important et une asthénie. Cette phase est asymptomatique chez les malades résidant en zones endémiques et l'intensité des symptômes peut également varier en fonction des espèces de schistosomes.

❖ Phase d'état

La phase d'état correspond à l'installation des vers adultes sur le site définitif et elle est liée à la ponte intensive des femelles. Elle se révèle plusieurs semaines voire quelques années après la contamination. La symptomatologie est également dépendante de l'espèce, on distingue classiquement :

➤ **La schistosomiase intestinale** due à *S. intercalatum* et *S. mansoni* :

Les manifestations cliniques sont essentiellement digestives avec d'importantes douleurs abdominales, un syndrome diarrhéique ou dysentérique, et parfois l'apparition de rectorragies. C'est la migration des œufs de schistosomes adultes à travers la muqueuse intestinale qui est responsable d'une inflammation granulomateuse de la muqueuse, de la présence de pseudo-polypes, de micro-ulcérations ainsi que d'hémorragies superficielles. La majorité des lésions sont situées dans le rectum et le côlon (*Gryseels, 2006*). La complication la plus grave est l'atteinte hépatosplénique résultant de l'enkystement des œufs dans le foie et la rate. Une fois bloqué, l'œuf devient le centre du granulome bilharzien, à l'origine de fibrose et pouvant induire une hypertension portale, une splénomégalie, une anémie, un retard de croissance ainsi que la formation de varices oesophagiennes dont la rupture peut s'avérer fatale.

➤ **La schistosomiase uro-génitale** induite par *S. haematobium* :

Il s'agit de l'espèce présente essentiellement au niveau du plexus vésical. L'hématurie est le principal signe clinique observé. Elle est néanmoins fréquemment associée à une dysurie, des douleurs sus-pubiennes et une pollakiurie chronique et intense (Kjetland et al. 2012). On retrouve des formations granulomateuses papillomateuses, des nodules sur la paroi vésicale pouvant évoluer en fibrose avec calcification. Les atteintes du tube digestif sont présentes mais moins fréquentes que lors d'une schistosomiase à *S. mansoni*. Elles sont souvent associées à une atteinte rectale asymptomatique et une diminution de fertilité. Une corrélation entre le cancer de la vessie et l'infestation à *S. haematobium* a également été démontrée dans de nombreux cas. En effet, les œufs piégés dans la paroi de la vessie conduisent à une hématurie et à une inflammation chronique, augmentant le risque d'hyperplasie urothéliale, de dysplasie et de cancers de la vessie. Chez les patients vivant en zones endémiques le carcinome épidermoïde représente la plupart des cancers de la vessie tandis que dans les pays non endémiques, ce sont les carcinomes à cellules urothéliales (UCC) qui sont majoritairement retrouvés (Brindley et al. 2015).

➤ **La schistosomiase artério-veineuse** provoquée par *S. japonicum* et *S. mekongi* :

Les bilharzioses à *S. japonicum* et *S. mekongi* sont caractérisées par la gravité de l'atteinte hépatique. Les conséquences sont la splénomégalie, les hémorragies digestives par rupture des varices œsophagiennes avec une forte mortalité. De nombreuses atteintes ectopiques sont également décrites (complications cardio-pulmonaires (Cheever 1985) et neurologiques (Hayashi 1979)).

➤ **La schistosomiase rectale** due à *S. intercalatum* et *S. guineensis* :

Les signes cliniques sont digestifs avec des diarrhées importantes et la présence de rectorragies. La splénomégalie est également fréquente en zones endémiques pour *S. intercalatum*. La sphère urinaire peut être atteinte avec l'apparition de dysurie, d'inconfort périnéal et d'hémospermie (Corachan et al. 1987).

❖ Atteintes ectopiques

Les atteintes ectopiques sont possibles et diverses. La localisation pulmonaire de la schistosomiase est retrouvée chez un tiers des patients infectés. Les manifestations cliniques sont secondaires à la formation des granulomes bilharziens dans le foie (Niemann et al. 2010). Dans le cas d'infestation à *S. haematobium*, les lésions pulmonaires observées seront tissulaires alors que pour les infestations à *S. mansoni*, les lésions seront majoritairement vasculaires (Carmoi et al. 2010). Bien que les symptômes cliniques et chroniques soient plus rares, le développement de fibrose pulmonaire et d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) sont constatés.

INTRODUCTION

L'atteinte neurologique due à la migration des œufs dans le système nerveux est la plus sévère des atteintes ectopiques (*Figure 17B*). Elle peut survenir à n'importe quel moment dès lors que la femelle commence à pondre et peut être symptomatique ou asymptomatique. Le cerveau et la moelle épinière peuvent être affectés indépendamment. Les symptômes cliniques vont dépendre de la quantité d'œufs dans la région du cerveau, de l'intensité de la réaction inflammatoire et de l'emplacement de la lésion. *S. mansoni* et *S. haematobium* sont responsables des bilharzioses médullaires induites par la contamination de cône médullaire et de la moelle dorsolombaire. Des signes d'hypertension intracrânienne, des céphalées aiguës, des troubles visuels, ainsi que des hémorragies cérébrales et méningées peuvent survenir (*Ross et al. 2012*). Dans les cas de schistosomiasis à *S. japonicum*, les granulomes sont intracrâniens tumoraux ou infiltratifs. Des maux de tête, de l'ataxie, des nausées et vomissements sont présents dans les formes pseudotumorales du cervelet. Plus rarement, le développement d'encéphalite ou d'encéphalomyélite peut se produire simultanément ou juste après la phase toxémique de la schistosomiase (syndrome de Katayama) (*Levy et al. 1975*).

L'appareil génital peut également être endommagé (*Kjetland et al. 2012*). Les schistosomiasis génitales succèdent souvent à la localisation urinaire de l'infestation et sont donc majoritairement liées à *S. haematobium*. Ce sont les anastomoses des vaisseaux génitaux avec ceux des voies urinaires et du rectum, qui vont permettre aux œufs de s'enkyster dans le tractus génital. Chez la femme, les ovaires, les trompes, le vagin ainsi que la vulve peuvent être atteints mais le col de l'utérus reste la partie la plus concernée par l'infestation. Dans les cas les plus graves, elle est responsable de salpingites, de métrites, d'avortements et d'infertilité (*Kjetland et al. 2012*).

La schistosomiase génitale facilite également la pénétration de pathogènes tels que le virus HPV (Human Papillomavirus) et HIV (Human Immunodeficiency Virus). Chez l'homme, on observe principalement des lésions au niveau prostatique avec l'apparition de fibroses et calcifications.

Enfin, les manifestations ectopiques peuvent être cutanées (*Figure 17A*) mais aussi articulaires (*de Mota et al. 2014*). Des dépôts d'œufs au niveau de la peau avec formation de granulomes ont déjà été observés. Ainsi, les lésions cutanées extragénitales sont retrouvées au niveau thoracique, iliaque et préombilicale et sont principalement causées par *S. mansoni* et *S. haematobium* (*MacDonald et Morrison 1976*). Les granulomes synoviaux vont être responsables d'arthrites aiguës ou chroniques. D'autres études ont également montré la présence d'œufs embolisés au niveau du larynx, du nasolarynx, de l'oreille moyenne et des structures de l'œil.

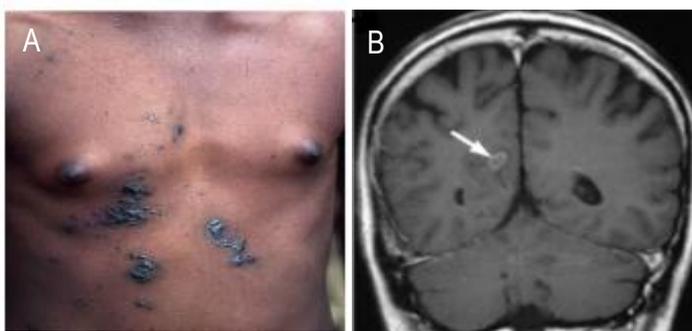


FIGURE 17 : Manifestations ectopiques de la schistosomiase. A- Atteinte cutanée. B- Neuroschistosomiase. Les lésions induites par les œufs de schistosomes sont détectées en imagerie de résonance magnétique. La flèche indique la présence d'un granulome (*Gray et al. 2011*)

4- Les Co-infestations

Bien que les interactions entre les schistosomes et *Plasmodium falciparum* d'une part et les schistosomes et le virus de SIDA d'autres part, soient les plus décrites, les co-infections à schistosomes peuvent également concernées les bactéries et d'autres helminthes. Les co-infections schistosomes-*Fasciola*, *Leishmania*, *Entamoeba* ou *Salmonella* ont pour la plupart des effets délétères sur l'hôte, pourtant certains pathogènes semblent diminuer les symptômes associés aux deux pathologies.

➤ Interaction schistosomes-*Plasmodium falciparum*

Le paludisme et la schistosomiase sont les principales maladies parasitaires présentes dans les pays en développement, particulièrement en Afrique subsaharienne, et leur coexistence épidémiologique est très fréquemment observée (Degarege et Erko 2016). De nombreuses études mettent en évidence l'existence d'interactions entre les réponses biologiques, histologiques et immunitaires induites par la présence simultanée de deux parasites. L'orientation de ces différentes réponses sera néanmoins dépendante de l'espèce de schistosome et de la charge parasitaire associée, de l'âge du malade ainsi que de la parasitémie palustre.

Des travaux réalisés sur la souris ont montré qu'une infestation par *S. mansoni* suivie d'une infestation par *P. chabaudi* chez des souris CBA induisait une diminution de la parasitémie (Lwin et al. 1982). De plus, chez des souris infestées simultanément par *P. berghei* et *S. mansoni*, une diminution de la formation des granulomes dans les poumons est constatée par rapport aux souris mono-infectées par le plathelminthe. La co-infestation entre *P. falciparum* et *S. haematobium* a été examinée chez l'Homme et les études montrent que les hôtes co-infestés présentent une diminution de la parasitémie, de l'anémie ainsi que des symptômes associés aux deux parasites (Nmorsi et al. 2009). Il semblerait pourtant que ces effets soient observés uniquement chez les jeunes enfants. Dans le cas d'interaction entre *S. mansoni* et *P. falciparum*, la co-infestation chez les adultes semble avoir un effet négatif avec une forte augmentation des accès palustres ou de l'hépatosplénomégalie (Wilson et al. 2009). Un effet âge-dépendant a également été observé où la parasitémie semble plus élevée chez les enfants de moins de 14 ans que chez les enfants plus âgés (Faye et al. 2008). Une meta-analyse réalisée sur la base de toutes les études publiées sur la co-infestation entre *P. falciparum* et *S. mansoni* ou *S. haematobium* a démontré que l'interaction entre ces deux parasites était associée à une augmentation de la prévalence d'infestation asymptomatique ou sans complications par l'apicomplexe (Degarege et al, 2016). Les auteurs ont également montré que cette interaction aurait un effet protecteur contre une infestation de haute densité à *P. falciparum* (Degarege et al. 2016).

➤ Interaction schistosomes-VIH

La schistosomiase urinaire est fréquente en Afrique subsaharienne puisque l'OMS estime que 45 millions de femmes vivant dans cette région, sont infestées. De plus, des études ont montré que 17% des patients infestés

par le VIH et originaires d'Afrique subsaharienne, étaient séropositives pour la schistosomiase (*Smith et al. 2008*). Les femmes et les hommes atteints de schistosomiase urinaire présentent donc un risque significativement accru de contracter et de transmettre le VIH à leurs partenaires sexuels. Lors de l'infestation, le parasite va occasionner un amincissement de l'épithélium et une inflammation locale de la vessie, des uretères, mais aussi du vagin et du col de l'utérus. La perturbation de l'intégrité des épithéliums ainsi que l'inflammation associée, vont faciliter la pénétration et la contamination par le VIH (*Mabey 2000*). En effet, les réponses immunitaires induites par la présence d'œufs vont permettre le recrutement de cellules immunitaires activées CD4⁺ qui expriment le récepteur à la chimiokine CCR5, donnant ainsi la possibilité au virus de se lier.

5- Méthodes de diagnostic

Le diagnostic de la bilharziose repose sur différents éléments d'orientation, qu'ils soient épidémiologiques, cliniques ou biologiques. Les méthodes utilisées seront également variables au cours du cycle parasitaire. Pendant la phase d'invasion, une éosinophilie importante ainsi qu'une réaction sérologique positive dans les 3 à 4 semaines après l'infestation sera observée. Pendant la phase toxémique, l'activité métabolique est intense, l'hyperéosinophilie restera donc élevée et les réactions sérologiques seront très marquées surtout pour *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. mekongi*, où les taux sanguins d'éosinophiles pourront parfois s'élever entre 40 et 70%. Enfin, durant la phase d'état, il y a émission des œufs qui seront retrouvés dans les selles ou les urines, voir dans des biopsies.

Dans les pays non endémiques, les techniques indirectes sont privilégiées. Elles sont utilisées notamment pour mettre en évidence une exposition au parasite, la nécessité de réaliser des examens plus approfondis et donc d'orienter le diagnostic. Les méthodes immunologiques se restreignent à la détection d'anticorps spécifiques (*Hinz et al. 2017*), le dosage d'antigènes parasitaires circulants tels que les CAA (Circulating Anodic Antigen) et les CCA (Circulating Cathodic Antigen). Les tests immunologiques d'hémagglutination indirecte (HAI), de type ELISA ou d'immunofluorescence indirecte (IFI) sont généralement les plus utilisés par les laboratoires. La détection d'antigènes circulants s'effectue principalement par ELISA-sandwich. Ce sont essentiellement le CAA et le CCA qui sont recherchés dans le sang ou les urines (*Ochodo et al. 2015*).

Les techniques de diagnostic directes vont permettre la détection des œufs dans des échantillons de selles ou d'urines. Elles sont généralement utilisées en première intention dans les zones endémiques ou pour confirmer l'infestation par le parasite. Dans le cas de bilharziose à *S. haematobium*, l'évaluation de la parasitose se fait par une technique de filtration des œufs sur membrane de polycarbonate (*Talaat et Evans, 1996*) ou de polyamide (*Mott et al. 1982*), suivi d'un examen microscopique. L'excrétion des œufs étant variable en fonction de la concentration des urines et de l'activité physique, le test sera préférentiellement réalisé en fin de miction ou après un effort physique. La schistosomiase intestinale est diagnostiquée grâce à la technique de Kato-Katz. Décrite

pour la première fois par *Kato et Miura* en 1954 et standardisée par *Katz* en 1972, elle permet de rendre un résultat semi-quantitatif sur le nombre d'œufs présent dans un échantillon de selles. Les œufs sont concentrés par sédimentation dans une solution de glycérine, colorés et observés au microscope à faible grossissement. Elle permet également de réaliser un diagnostic d'espèces. En définitive, les techniques directes sont très bien adaptées aux zones endémiques de par leur rapidité et leur facilité d'exécution ainsi que leur faible coût. Néanmoins, elles ne sont applicables que pendant la phase aigüe, sont peu sensibles et ne permettent pas de détecter les infestations de faible intensité. D'autres techniques telles que des méthodes diphasiques utilisant le formol-éther permettent de diagnostiquer des parasites en plus faible quantité (*Ebrahim et al. 1997*). Les méthodes de flottaison (FLOTAC (*Cringoli 2006*) et Mini-FLOTAC (*Cringoli et al. 2017*)) sont également plus sensibles mais plus longues et difficiles à réaliser. Notons cependant que le test de Kato-Katz est une technique très peu sensible qui sous estime par conséquent, le nombre d'individus infestés et sur-estime les effets de la chimiothérapie (*Kittur et al. 2016*). Ainsi, la prévalence de la schistosomiase serait bien plus élevée en réalité que les estimations actuelles l'indiquent, d'où la nécessité de développer de nouveaux programmes d'élimination de la maladie (*Colley et al. 2017*).

Des méthodes de diagnostic rapide ont également été développées. Nous pouvons donner comme exemple la détection par PCR de l'ADN parasitaire (*Wichmann et al. 2009 ; Härter et al. 2014*). Elle peut être appliquée précocement c'est-à-dire avant la ponte des œufs et permet de mettre en évidence les acides nucléiques issus du tégument des vers adultes, des schistosomules morts ainsi que de la désagrégation des œufs. Les échantillons biologiques utilisés sont le sang, l'urine, la salive, le liquide céphalo-rachidien, les selles ou encore le plasma.

6- Traitement

Jusque dans les années 60, les dérivés de l'antimoine ont constitué l'unique traitement contre la schistosomiase. Du fait de leur importante toxicité, ils ont été abandonnés pour être remplacés par de nouvelles molécules toutes aussi nocives pour l'organisme. L'Hycanthone non actif sur *S. japonicum*, était à l'origine d'hépatites mortelles. L'Oltipraz en raison de sa neurotoxicité n'est actuellement plus commercialisé. Le Métrifonate et le Niridazole, également toxiques mais mieux tolérés, ne sont plus distribués. Actuellement, la chimiothérapie qui est privilégiée repose principalement sur l'utilisation du Praziquantel (Biltricide®), traitement de référence contre la schistosomiase.

❖ Le Praziquantel (PZQ) :

Actuellement, le Praziquantel (PZQ) est la molécule de première intention choisie pour traiter la schistosomiase. Commercialisé sous le nom sous le nom Biltricide®, le PZQ est une pyrazinoisoquinoline utilisée initialement en tant qu'agent antipsychotique (*Figure 18A et B*). Son faible coût, un comprimé coûte environ 0,15 US\$ pour un

enfant et 0,30 US \$ pour un adulte, justifie son utilisation massive et systématique. Il est absorbé par voie orale en une prise unique, 80 % de la dose absorbée sera éliminée par voie urinaire en 24 heures. La dose généralement prescrite est de 40 mg/Kg pour *S. mansoni* ou *S. haematobium* et de 60 mg/Kg pour une infection à *S. japonicum* (<http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Jh2923f/3.1.4.html>).



FIGURE 18 : Le Praziquantel.

A - Comprimé de PZQ et conditionnement. B- Formule du PZQ : [2-cyclohexylcarbonyl-1, 2, 3, 6, 7,11B-hexahydro-4HPYRAZINO (2,1-a) isoquinoline-4-one]

Le mode d'action du PZQ est encore mal connu. Il semblerait toutefois qu'il induise la tétanisation de la musculature des vers adultes et une vacuolisation du tégument. Ces effets, associés à une modification du tégument parasitaire sous l'effet d'une rentrée d'ions calciques, entraînent la mort des parasites qui seront ensuite pris en charge par le système immunitaire. L'interaction entre le PZQ et les sous-unités β de canaux calciques voltage-dépendants de *S. mansoni* et *S. japonicum* a fourni un mécanisme d'action plausible proposé par *Kohn et al.* en 2001. L'hypothèse que le PZQ pourrait perturber les canaux calciques a été soutenue par des travaux utilisant la cytochalasine D ainsi que des inhibiteurs calciques (*Pica-Mattoccia et al.* 2007). Récemment, il a également été démontré que le PZQ était un ligand des GPCRs (*Chan et al.* 2017).

Il est efficace sur toutes les formes de schistosomiase, aussi bien au stade aigu qu'en cas d'atteinte hépatosplénique importante. De plus, même lorsqu'on ne parvient pas à éradiquer l'infestation, une diminution significative du nombre d'œufs dans les selles ou les urines pendant plus d'un an, est observée.

L'une des limites de ce composé est son inefficacité sur le stade schistosomule et les vers juvéniles (*Sabah et al.* 1986). De plus, il n'occasionne aucune protection contre la ré-infestation. Le PZQ est néanmoins une molécule très bien tolérée. Cependant, dans le cas d'infestation massive, le traitement peut provoquer divers effets indésirables discrets ou transitoires qui disparaîtront en moins de 24 h. Il s'agit généralement de gênes abdominales, de nausées, de céphalées, de vertiges, de somnolence et plus rarement, de pyrexie, d'urticaire et d'hémorragies rectales (*Berhe et al.* 1999).

Deux autres limitations à l'administration du PZQ, particulièrement aux jeunes enfants, peuvent être mentionnées : son goût qui est extrêmement amer et la taille des comprimés (*Figure 18A*). Ces deux caractéristiques sont

liées au fait que le PZQ disponible actuellement est un mélange de deux énantiomères (R) et (S). L'activité thérapeutique est due à la forme (R), et le goût amer à la forme (S) (Meyer et al. 2009). Une formulation contenant uniquement le (R)-PZQ schistosomicide permettrait à la fois de réduire la taille des comprimés et d'éliminer leur goût repoussant. Un consortium impliquant la compagnie pharmaceutique Merck Serono a été constitué visant à développer une telle formulation pédiatrique du PZQ (<https://www.pediatricpraziquantelconsortium.org>).

Plusieurs études épidémiologiques semblent montrer que le PZQ permet de guérir environ 90% des schistosomiasis (Danso-Appiah et al. 2008, 2013 ; Olliaro et al. 2011 ; Lovis et al. 2012). Cependant, le traitement répété lors de traitement de masse (Mass Drug Administration) tel que pratiqué dans le cadre du Schistosomiasis Control Initiative (<https://www.imperial.ac.uk/schistosomiasis-control-initiative>) est associé avec une réduction de l'efficacité de la molécule (Crellen et al. 2016) et a favorisé l'émergence de souches parasitaires tolérantes (Crellen et al. 2016). En effet, des souches tolérantes ont été identifiées en Egypte et au Sénégal et il est possible d'induire des souches résistantes en laboratoire (Fallon et Doenhoff 1994 ; Xu et al. 2006). Toutefois, bien que le mécanisme précis de cette tolérance/résistance, ainsi que le mode d'action du PZQ, reste énigmatique, l'inhibition ou l'inactivation de transporteurs ABC semble impliquée puisqu'ils augmenteraient la susceptibilité de schistosomes adultes et juvéniles à la drogue. De plus, les auteurs suggèrent donc que l'utilisation d'inhibiteurs de transporteurs ABC pourrait représenter une stratégie pour surmonter la susceptibilité réduite de schistosomes au PZQ (Kasinathan et al. 2014).

❖ Molécules alternatives au PZQ :

L'Oxamniquine et les dérivés de l'Artémisinine font partie des molécules pouvant être utilisées comme traitement contre la schistosomiase. De nombreuses études ont mis en évidence leurs efficacités sur différentes espèces de schistosomes.

L'Oxamniquine est une tétrahydroquinoléine dont le spectre d'action est étroit car limité à *S. mansoni* (Figure 19A). Comme le PZQ, elle est efficace uniquement sur les vers adultes et les mâles seraient plus sensibles que les femelles à la molécule. L'administration se fait par voie orale, le pic plasmatique est atteint en 1 à 4h et l'excrétion est essentiellement urinaire, sous la forme de deux métabolites n'ayant pas d'action schistosomicide. Cette molécule est principalement utilisée en cas de tolérance au PZQ et une faible posologie (15 à 20 mg/kg en une seule prise) permet d'obtenir par exemple chez les adultes 60 à 95% de taux de guérison, notamment chez les populations vivant en Amérique du Sud. Des doses plus élevées sont conseillées (30 mg/kg à 60 mg/kg en 2 à 3 jours) dans des pays comme l'Afrique de l'Est, du Sud et Centrale, en Égypte et au Zimbabwe. Les effets secondaires observés sont transitoires avec l'apparition d'une somnolence, de céphalées, de vertiges, parfois d'hallucinations, des vomissements ou de diarrhées. Bien que généralement décrits comme mineurs, chez certaines populations les vertiges et la somnolence sont très marqués et rendent ce traitement inacceptable (Gryseels et al. 1987).

Les dérivés de l'Artémisinine tels que l'Artésunate ou encore l'Artéméther (*Figure 20B*) ont également été testés comme traitement en combinaison avec la PZQ ou parfois seuls. Utilisés principalement comme anti-paludiques (<http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/>), ils sont également efficaces sur *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*. Contrairement au PZQ, ces molécules présentent une efficacité plus importante sur les schistosomules que sur les vers adultes. Toutefois, malgré l'efficacité démontrée des dérivés d'Artémisinine chez les patients infestés par le schistosome (*Saeed et al. 2016*), leur utilisation systématique pourrait favoriser l'émergence de souches de *P. falciparum* résistantes contre ce traitement, dans des zones d'endémie où sont retrouvés les deux parasites. Néanmoins, leur emploi en thérapie combinée avec le PZQ reste possible.

Bien que le mécanisme d'action contre le schistosome soit encore inconnu, certaines données suggèrent que les Artémisinines auraient un impact sur la teneur en glycogène des schistosomes (*Utzinger et al. 2001*), s'accompagnant d'altérations morphologiques similaires à celles induites par le PZQ. De plus, les résultats issus d'une méta-analyse récente, confirment que les dérivées de l'Artémisinine utilisés en association avec le PZQ auraient la capacité d'augmenter les taux de guérison (*Pérez del Villar et al. 2012*).

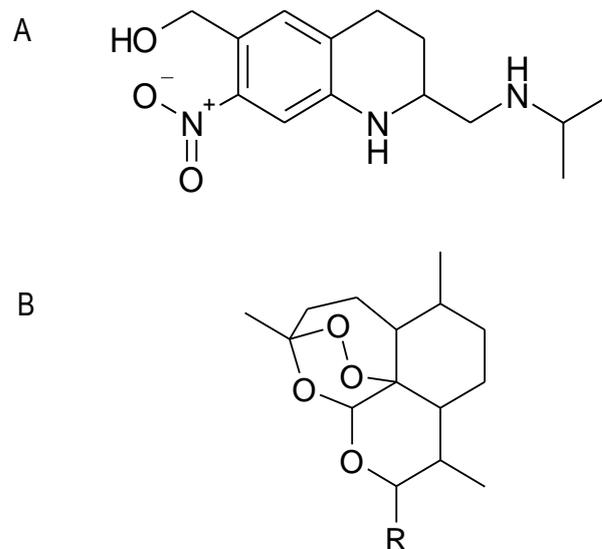


FIGURE 19 : Molécules alternatives aux PZQ.
A- Molécule d'Oxamniquine. **B-** Dérivés de l'artémisine

7- Prophylaxie

Afin de faire reculer la morbidité et de réduire la transmission, la lutte contre la schistosomiase s'est depuis toujours concentrée sur le parasite présent à l'intérieur de son hôte définitif humain et sur le mollusque. Ainsi, c'est au début du XXe siècle, en Égypte et au Japon, qu'ont eu lieu les premières tentatives de lutte contre cette

helminthiase basée sur de telles mesures. En 1920, par exemple, l'Égypte a mis en place le premier traitement de masse ciblant les adultes et les enfants par administration de dérivés antimoinés par voie intraveineuse. Depuis sa création en 1948, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'importance de la schistosomiase sur le plan de la santé publique et développe des nouvelles stratégies de lutte.

❖ Individuelle:

La prophylaxie individuelle s'applique à l'infestation ou à la maladie et concerne globalement les voyageurs de retour de zones endémiques. Il peut être proposé une prophylaxie de la maladie par simple prescription d'un traitement, généralement le Praziquantel. Le contexte de contamination plausible, ainsi que la présence d'une hyperéosinophilie sanguine vont aussi orienter la prescription. L'infestation peut également être empêchée et les mesures à prendre sont simples et souvent efficaces. Elles consistent notamment à éviter toute immersion même partielle en eau douce non contrôlée. Lors de contacts obligatoires avec une eau suspecte, le port de chaussures hautes et pantalon serré aux chevilles doit être obligatoire. En cas de contact accidentel avec une eau potentiellement contaminée, la durée d'exposition doit être limitée ainsi que la surface corporelle immergée, ces deux paramètres étant liés à l'intensité de l'infestation.

❖ Collective:

Dans les régions endémiques, la lutte contre la schistosomiase est en principe possible, mais souvent confrontée à d'importantes difficultés de réalisation. Les programmes actuels cherchent donc à limiter l'extension endémique et améliorer la situation des populations concernées. La déclaration de Londres du 30 janvier 2012, signée par diverses sociétés pharmaceutiques, organisations gouvernementales et donatrices ainsi que par les pays endémiques prévoit par ailleurs un contrôle, une élimination voire une éradication des maladies tropicales négligées d'ici 2020 afin d'améliorer la vie de plus d'un milliard de personnes (<https://unitingtocombatntds.org/london-declaration-neglected-tropical-diseases/>).

➤ Lutte contre la transmission

La prophylaxie peut passer par l'élimination des vecteurs à l'aide de molluscicides chimiques et végétaux ou encore par l'introduction de prédateurs biologiques.

Le principal objectif de l'utilisation des molluscicides est de réduire, mais surtout de contrôler la transmission du parasite par une élimination raisonnable des populations de mollusques infectés. Souvent utilisé en combinaison avec la chimioprophylaxie, le molluscicide tel que le Niclosamide par exemple est très utilisé en Afrique et en Chine (*Li et Wang 2017*). Cette molécule est active sur les mollusques et les cercaires. Bien qu'elle soit nocive pour les poissons et les amphibiens, elle est peu toxique pour le bétail et l'Homme. D'autres approches

permettant l'élimination des escargots hôtes ont été élaborées telle que l'introduction de prédateurs dans l'habitat des mollusques (crevette *Macrobrachium vollehovonii*), de souches d'escargots résistantes à *S. mansoni*, ou encore l'utilisation de plantes molluscicides (Li et Wang 2017).

La lutte contre la transmission passe également par l'éducation des populations et notamment par la protection de l'eau des excréta. La mise en place de systèmes sanitaires adéquats et un accès à une eau non contaminée par le parasite pour la baignade et effectuer les tâches quotidiennes, demande un investissement considérable de la part des pays endémiques. Cependant, bien que la sensibilisation des populations vivant en zones endémiques soit très longue et indissociable de l'amélioration de leur niveau socio-économique, elle reste un facteur essentiel de la stratégie de lutte contre la schistosomiase. Nous pourrions donner l'exemple de l'Égypte et de Porto-Rico, qui ont été capable de réduire les cas de bilharziose ou encore le Maroc et le Japon, où la maladie a été éradiquée.

➤ **Lutte contre le réservoir parasitaire**

La chimioprophylaxie en masse des populations à risque, demeure un des moyens le plus efficace de diminuer la prévalence de l'infection et de la transmission. L'OMS axe d'ailleurs sa stratégie de lutte sur la réduction de la morbidité, grâce au Praziquantel, en traitant régulièrement les personnes exposées au risque de schistosomiase. Les groupes ciblés sont les enfants d'âge scolaire vivant en zones d'endémie, les adultes exposés aux risques (femme enceinte, femmes allaitantes, personnes en contact avec les eaux contaminées tels que les agriculteurs et les pêcheurs) et l'ensemble de la population des communautés résidant en pays endémique (Figure 20). En collaboration avec l'OMS, divers programmes nationaux et internationaux ont été développés dans le but de lutter plus efficacement contre cette parasitose. L'initiative de lutte contre la schistosomiase (SCI, <https://www.imperial.ac.uk/schistosomiasis-control-initiative>) par exemple aide les gouvernements des pays africains. Fondée en 2002 et financée par des subventions de la Fondation Gates et de l'USAID (U.S. Agency for International Development), elle assiste l'OMS dans la distribution de comprimés de PZQ. Ainsi dans certains pays en développement, la chimioprophylaxie de masse a permis de diminuer drastiquement l'impact de la maladie en l'espace de 20 ans seulement (ex : Chine, Japon, Brésil). Toutefois, il été montré que seulement 34,4% des personnes ayant besoin d'une chimioprophylaxie ont été traités. Ces données, datant de 2016, suggèrent que l'accès au Praziquantel constitue aussi une limite dans la lutte contre la parasitose.

Catégorie	Prévalence initiale chez les enfants d'âge scolaire	Mesures à prendre ^b	
Communauté exposée à un risque élevé	50% selon les examens parasitologiques ^c (schistosomiase intestinale et urogénitale) OU 30 % selon un questionnaire sur les antécédents d'hématurie	Traiter tous les enfants d'âge scolaire (scolarisés ou non) une fois par an	Traiter aussi tous les adultes considérés comme exposés au risque (groupes particuliers ^d ou communautés entières vivant dans des zones d'endémie
Communauté exposée à un risque modéré	10% mais moins de 50% selon les examens parasitologiques (schistosomiase intestinale or urogénitale) OU moins de 30 % selon un questionnaire sur les antécédents d'hématurie	Traiter tous les enfants d'âge scolaire (scolarisés ou non) une fois tous les 2 ans	Traiter aussi tous les adultes considérés comme exposés au risque (groupes particuliers ^d uniquement)
Communauté exposée à un risque faible	Moins de 10 % selon les examens parasitologiques (schistosomiase intestinale ou urogénitale)	Traiter tous les enfants d'âge scolaire (scolarisés ou non) deux fois en tout (une fois à l'âge d'entrée à l'école primaire, une fois à la sortie de l'école primaire par ex.)	Le praziquantel doit être disponible dans les dispensaires et centres de santé pour traiter les cas suspects

FIGURE 20 : Stratégie adoptée par l'OMS concernant la chimioprophylaxie de la schistosomiase (d'après « Rapport de situation 2001–2011 et plan stratégique 2012–2020 », OMS 2013).

➤ Démarches et stratégies vaccinales

Bien que de nombreuses stratégies de lutte contre la schistosomiase aient été mises en place, le développement d'un vaccin serait le moyen le plus efficace de réduire les manifestations pathologiques et le potentiel de transmission du parasite. Les premiers travaux effectués dans le but d'élaborer un vaccin ont permis d'identifier les mécanismes effecteurs de la réponse immune contre *S. mansoni* et *S. haematobium* ainsi que de nombreuses molécules potentiellement vaccinales.

Parmi elles, les protéines Sh-28-GST, Sm14-FABP, SmTSP-2 et Sm-p80 s'avèrent être les plus prometteuses puisqu'elles semblent extrêmement efficaces notamment dans différents modèles animaux.

Le Bilvax est à l'heure actuelle, le candidat vaccinal, le plus encourageant. Il utilise la Glutathione S-transférase 28 KDa de *S. haematobium* (Sh-28-GST) identifiée par les équipes du Pr Capron à l'Institut Pasteur de Lille. Elle joue un rôle dans le métabolisme des acides gras, la synthèse de la prostaglandine D2 ainsi que dans l'échappement du parasite au système immunitaire de l'hôte (Tebeje *et al.* 2016). Les essais cliniques de phase I et II réalisés en Europe sur des adultes et au Sénégal sur des enfants, ont également mis en évidence le développement d'une réponse immune de type Th2 avec présence d'IgG, IgA, INF- γ , IL-5 et IL-13. Il semble également que Bilvax soit sans danger pour les adultes et les enfants sains et infectés. Un essai clinique de phase III visant à évaluer si le bilhvax et l'administration de PZQ retarderaient les rechutes pathologiques dues à l'infection à *S. haematobium* chez les enfants infestés a été mené de 2009 à 2012, mais les résultats obtenus ne justifient pas l'utilisation de ce vaccin à grande échelle.

La protéine Sm14 est une FABP (Fatty-Acid Binding Protein) qui est impliquée dans l'assimilation des lipides de l'hôte par les parasites (Tendler *et al.* 1996a). En effet, les schistosomes sont incapables de synthétiser les stéroïdes et les acides gras, ils dépendent donc entièrement de l'hôte mammifère pour se fournir en acides gras essentiels.

INTRODUCTION

Chez la souris, l'utilisation de la protéine recombinante rSm14 a montré une diminution de 67% de la charge parasitaire de *S. mansoni* (Tendler et al. 1996b). Ces études ont aussi démontré une protection contre la douve du foie *Fasciola hepatica* (Tendler et al. 1996b). Par ailleurs, les essais cliniques de phase I réalisés au Brésil mettent en évidence une réponse Th1/Th2 avec une accumulation du TNF α , IL-2, IL-10, ainsi qu'une forte réponse IgG. L'essai clinique en phase I de ce candidat vaccin montre qu'il est bien toléré et fortement immunogène (Santini-Oliveira et al. 2015) ce qui lui permettra probablement de passer en phase II.

Les tétraspanines sont des protéines très abondantes du tégument parasitaire. Elles sont localisées au niveau de la membrane externe du tégument et sont donc fortement exposées au système immunitaire de l'hôte (Braschi et al. 2006). Les tétraspanines majeures chez *S. mansoni* sont SmTSP-1 et SmTSP-2. L'aspect protecteur de cette dernière a été mis en évidence chez la souris où une réduction de 57 à 64% de la charge parasitaire a été observée.

SmTSP-2 est actuellement développé par le *Sabin Vaccine Institute Development Partnership* en tant que vaccin recombinant SmTSP-2/Alhydrogel® de 9 kDa en combinaison avec l'adjuvant GLA-AF. Bien que les résultats ne soient pas encore connus, le vaccin candidat a complété un essai clinique de phase I (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03110757>).

Smp80 est une calpaïne de 78kDa. C'est une cystéine calcium-dépendante retrouvée au niveau de la musculature et du tégument du schistosome (Siddiqui et al. 1993). Elle possède d'ailleurs un rôle dans le renouvellement du tégument et donc dans l'échappement du parasite au système immunitaire. Cette molécule potentiellement vaccinante vise à bloquer l'activité protéolytique de la protéine par fixation d'IgG. Chez la souris, les tests effectués montrent une diminution de 50% de la charge parasitaire, de même chez les babouins, ainsi qu'une réduction quasi totale du nombre d'œufs pondus chez ces deux espèces. La protéine recombinante Smp80 induit également une protection contre *S. haematobium* chez les hamsters et les babouins (Karmakar et al. 2014b ; 2014a). De manière intéressante, des titres d'anticorps robustes ont été détectés chez les souris jusqu'à 60 semaines après la vaccination avec la protéine recombinante. Il était prévu que le vaccin recombinant Sm-p80/GLA-SE, «*SchistoShield*», passe en essais cliniques de phases 1 et 2 en 2017 (Tebeje et al. 2016).

La Sm29 est présente au niveau du tégument des vers adultes et des schistosomules. Sous sa forme recombinante, elle induit une production élevée d'IgG1 et IgG3 chez les individus résistants à l'infection et à la réinfestation (Cardoso et al. 2006). Une protection de 26 à 48% a également été observée chez des souris BALB/c préalablement infestées par une souche brésilienne de *S. mansoni* (Alves et al. 2015). De plus, il a été montré qu'une protection plus importante avait été obtenue en combinant Sm29 avec Sm14. Une diminution de 40% de la charge parasitaire, ainsi qu'une réduction de la taille et du nombre de granulomes dans le foie des souris immunisées ont été obtenues. De même, chez la souris, l'association de Sm29 et SmTSP-2 semble entraîner une réduction du nombre de vers adultes de 22 à 35%, avec un titre plus élevé d'anticorps IgG1 et IgG2 et des taux accrus d'IFN γ et de TNF α par rapport à l'injection de la Sm14 seule (Fonseca et al. 2004).

INTRODUCTION

À l'heure actuelle, seul le Bilhvax a réussi à atteindre les essais cliniques de phase III et pourtant les résultats obtenus n'ont pas permis de justifier son utilisation dans le cadre d'une vaccination thérapeutique. De plus, les études réalisées dans le but de développer d'autres vaccins, semblent se heurter à de nombreuses difficultés et notamment au fait que le schistosome est un agent pathogène pluricellulaire complexe possédant des mécanismes d'évasion de la réponse immunitaire (*Tebeje et al. 2016*).

Les lysines désacétylases

Chez les organismes eucaryotes, le matériel génétique est compacté et organisé de façon précise. Des mécanismes essentiels tels que la transcription, la réplication ou encore la réparation de l'ADN, s'avèrent être dépendants de la dynamique et la flexibilité du génome. Dans le noyau d'une cellule eucaryote, la molécule d'ADN est présente sous la forme d'une structure nucléoprotéique, appelée chromatine, qui sera remodelée, condensée ou bien décondensée afin de moduler la transcription et l'expression des gènes. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. Il constitue le premier niveau de compaction de l'ADN (*Figure 21*). Le nucléosome est composé d'une séquence d'ADN de 147 pb entourant un octamère de petites protéines, les histones (*Richmond et al. 1997*) (*Figure 21*).

Les histones sont la cible de divers mécanismes épigénétiques qui vont contribuer à la modulation de la structure de la chromatine. Ces marques peuvent être des groupements chimiques ou de petite protéine qui vont être liées de manière covalente et réversible aux résidus cibles.

Ainsi, les histones peuvent être, par exemple, méthylées, acétylées, phosphorylées, ubiquitinylées, sumoylées ou encore glycosylées (*Rothbart et Strahl 2014*) (*Figure 21*).

Dans le cas des Modifications Post-Traductionnelles (MPT) présentes sur les histones, elles touchent principalement les queues amino terminales, le tout ayant pour conséquence de modifier l'organisation de la chromatine de la région touchée et donc moduler l'accessibilité à l'ADN dans ces régions. L'ensemble de ces changements va composer le «code des histones» (*Strahl et Allis 2000*).

L'acétylation des histones par exemple, a lieu sur des résidus lysines des histones H3 et de H4, mais également sur les queues N-terminales de H2A et H2B. Elle participe à la décompaction de la chromatine par l'ajout d'un groupement acétyle sur la lysine induisant ainsi la neutralisation de la charge positive des histones et ainsi une ouverture de la chromatine. Les MPT peuvent également avoir lieu sur des protéines autres que les histones. L'acétylation constitue une MPT majeure qui permet de réguler la fonction de la protéine cible par exemple ou encore l'affinité avec ses différents partenaires (*Drazic et al. 2016*). Elle est mise en place par des lysines acétyltransferases (KATs), et enlevée par des lysines désacétylases (KDACs).

Dans cette partie, nous allons détailler la structure, les fonctions ainsi que l'importance de développer des «épi-médicaments» dirigés contre les KDACs dans les cas de pathologies humaines comme le cancer, mais aussi les maladies infectieuses.

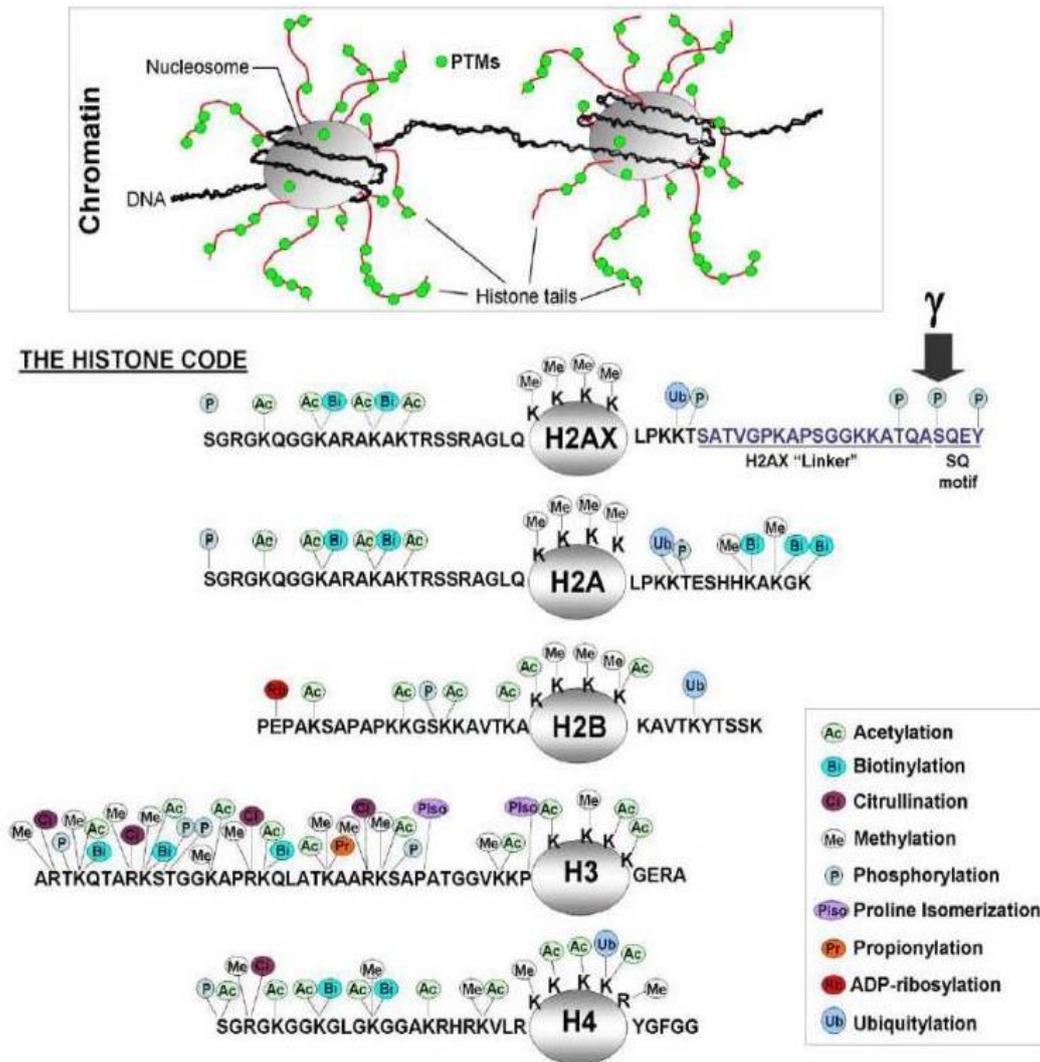


FIGURE 21 : Modifications des histones (Redon et al. 2012).

Les modifications post-traductionnelles présentes sur les histones se trouvent au niveau des extrémités N-terminales. Sur cette figure ne sont représentées que certaines d'entre elles.

A. Généralités sur les KDACs

Chez les eucaryotes, les histones ont été les premiers substrats des KATs et des KDACs identifiés, d'où leur nom d'histone acétyltransférases (HATs) et désacétylases (HDACs). Nous parlerons donc de KDAC d'un point de vue général, mais le terme « HDAC » sera tout de même employé pour nommer les différentes enzymes.

Les KDACs ont été d'abord mises en évidence chez les bactéries. Cependant, c'est en 1996, que *Taunton et al.* purifient la première KDAC humaine, HDAC1. À la même époque, chez la levure, son orthologue Rpd3 faisait l'objet de nombreuses études mettant en évidence son implication dans la régulation génique globale. L'importante similarité de séquence entre les deux protéines aurait permis de faire le lien entre la régulation de l'expression des gènes et l'acétylation des histones. Par la suite d'autres KDACs ont été identifiées, permettant,

grâce aux données structurales et aux homologies de séquences avec les protéines de levure, la constitution d'une classification.

Les KDACs sont des enzymes qui vont catalyser la perte d'un groupement acétyle de leur substrat qu'ils soient des histones ou non (Figure 22).

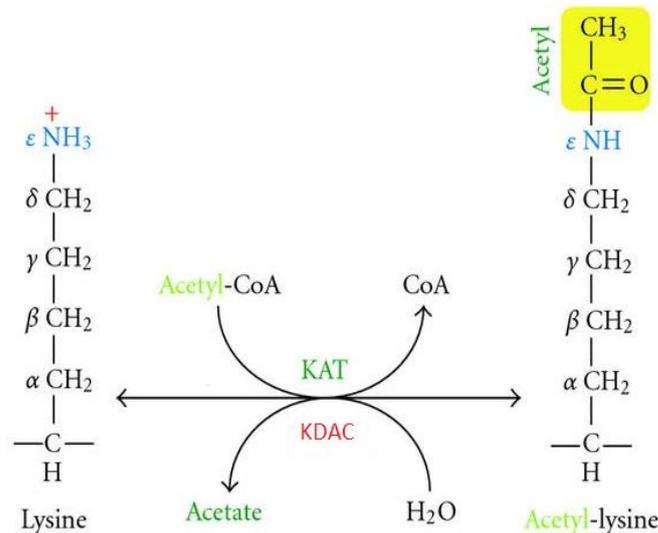


FIGURE 22 : Mécanisme d'acétylation réversible des lysines (Yang et al. 2010).

La KAT transfère le groupe acétyle (en vert) de l'acétyl-CoA à la chaîne latérale de la lysine. La désacétylation se produit selon deux mécanismes différents. Les KDACs Zn²⁺ dépendantes éliminent le groupe acétyle de l'AcK et libère un acétate, tandis que les sirtuines utilisent le NAD⁺ comme coenzyme et produisent l'O-acétyl-ADP-ribose et le nicotinamide.

Ce sont des enzymes très anciennes et hautement conservées puisqu'elles sont retrouvées chez les plantes, les animaux, les champignons, ainsi que chez les archaebactéries et les eubactéries (Figure 23). Par ailleurs, Gregoretta et al. (2004) ont montré que les KDACs étaient antérieures à l'évolution des histones suggérant ainsi que les substrats des KDACs ancestrales étaient probablement des protéines non-histones.

Les KDACs sont réparties en 4 classes ; les classes I, II et IV ont une activité dépendante des ions Zn²⁺, tandis que la classe III est composée des sirtuines, dépendantes du NAD⁺. Elles sont impliquées, comme nous l'avons vu dans des processus cellulaires clés tels que la régulation de l'expression des gènes mais aussi dans le cycle cellulaire ou encore dans la différenciation cellulaire. Elles font également l'objet de recherches intensives pour leurs rôles dans certaines pathologies, ce qui fait d'elles d'importantes cibles thérapeutiques.

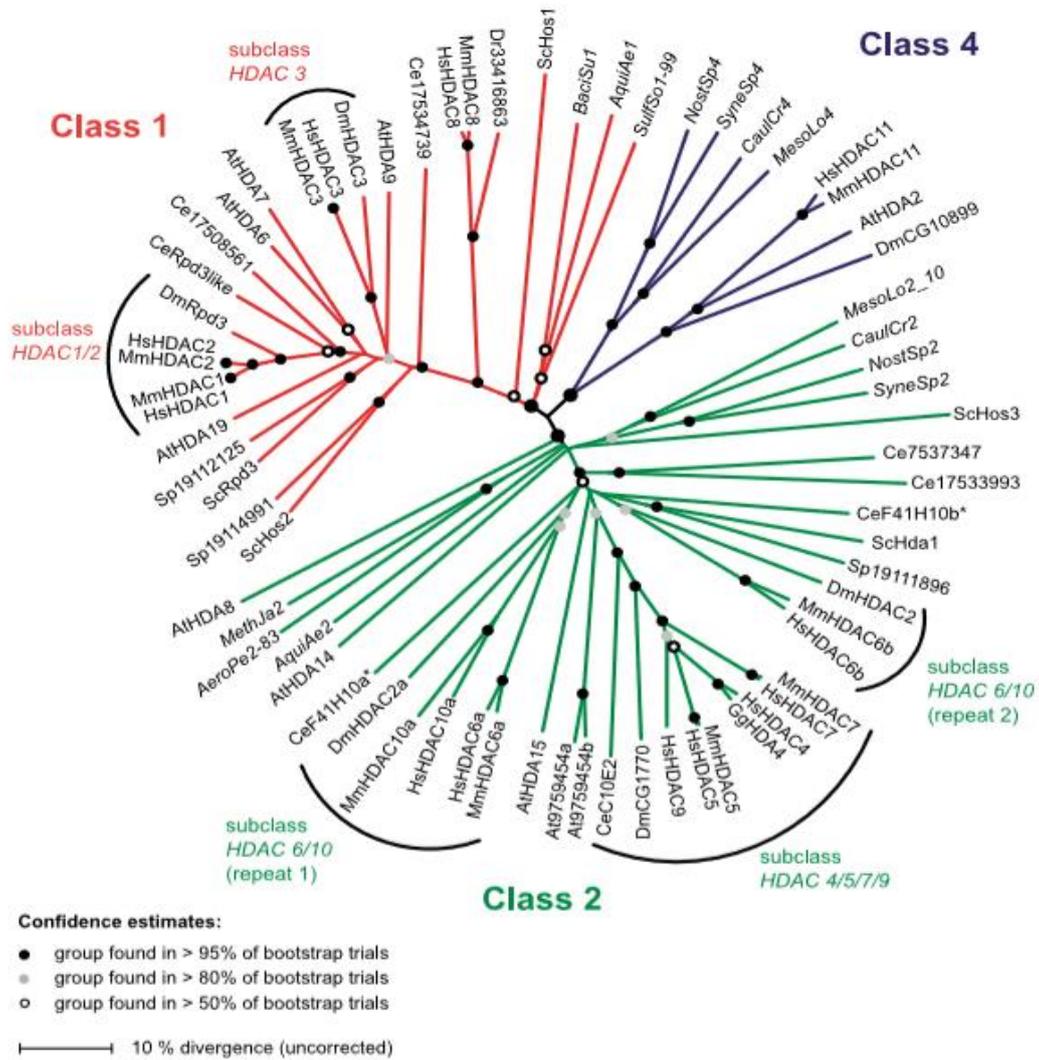


FIGURE 23 : Arbre phylogénétique des HDACs Zn²⁺ dépendantes eucaryotes (Gregoretti et al. 2004).

Abbreviations : Arabidopsis thaliana : At ; Caenorhabditis elegans : Ce ; Danio rerio (Poisson zèbre) : Dr ; Drosophila melanogaster : Dm ; Homo sapiens :Hs ; Mus musculus :Mm ; Saccharomyces cerevisiae :Sc ; Schizosaccharomyces pombe : Sp ; Aquifex aeolicus : Aquiae ; Bacillus subtilis : BaciSu ; Caulobacter crescentus : CaulCr ; Desulfovibrio desulfuricans : SulfoSo ; Mesorhizobium loti : MesoLo ; Neisseria meningitidis : NostSp ; Synechocystis sp : SyneSp2 ; Synechococcus sp : SuneSp4 ; Aeropyrum pernix : AeroPe ; Methanothermobacter jannaschii : MethJa

B. Les différentes classes de KDACs

1- Les KDACs Zn²⁺ dépendantes

La famille des KDACs dépendante d'un ion Zn²⁺ est composée de 11 membres, subdivisées en trois classes (classe I, II a/b et IV) sur la base de leur structure, homologie de séquence et organisation en domaine.

❖ [La classe I](#)

Les KDACs de classe I sont au nombre 4 : HDAC1, 2, 3 et 8. Cette classe de protéine est définie par une forte homologie de séquence avec la protéine de levure Rpd3 (Reduced Potassium Dependency), connue pour être un régulateur transcriptionnel. Elles sont caractérisées par un domaine catalytique très conservé, la présence de petites d'extensions amino et carboxy terminales (*Yang et Seto 2008*) ainsi que d'une séquence de localisation nucléaire (*Figure 24*).

Les protéines HDAC1 et HDAC2 possèdent 86% d'identité. Cette forte homologie de séquence s'explique par le fait qu'elles sont issues de la duplication génique d'un ancêtre commun, suggérant qu'elles n'ont subi qu'une faible divergence fonctionnelle (*Gregoretti et al. 2004*).

Au niveau structural, elles sont principalement composées du domaine catalytique responsable de l'activité désacétylase. En N-terminale, HDAC1, possède un domaine HAD (HDAC Association Domain) impliqué dans son homodimérisation et une séquence d'adressage au noyau. HDAC2 possède une organisation similaire bien qu'elle contient en C-terminale un domaine superhélice, impliqué dans les interactions avec ses partenaires. Ces deux KDACs sont localisées dans le noyau (*Figure 26*), avec une exception pour HDAC1 qui peut être cytoplasmique dans certaines pathologies. Ainsi, différentes études ont montrés qu'il est possible de retrouver HDAC1 dans le cytoplasme des axones chez l'Homme et des neurones murins (*Kim and Casaccia 2010*).

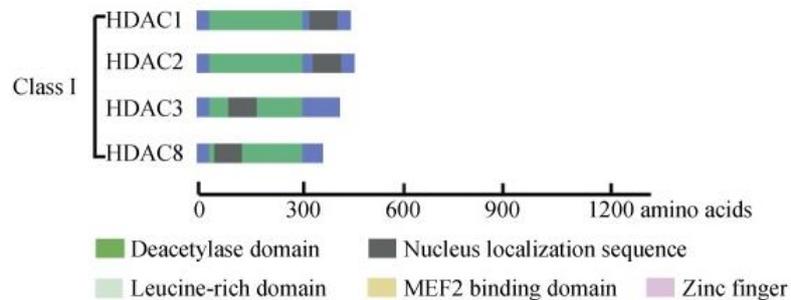


FIGURE 24 : Structure des différentes KDACs classe I (*Wang et al. 2015*).

HDAC3 partage respectivement 63% et 62% d'identité avec HDAC1 et 2 et seulement 43% d'identité avec HDAC8. En plus de son domaine d'adressage nucléaire, le NLS (Nucleus Localization Sequence) en C-terminale, elle contient un signal d'export nucléaire, le NES (Nucleus Export Signal) d'où sa localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique (*Figure 25 et 26*). De plus, HDAC3 est capable de former des homo-oligomères mais peut également s'associer avec d'autres KDACs de classe II (HDAC4, HDAC5 et HDAC7) (*Fischle et al. 2001*).

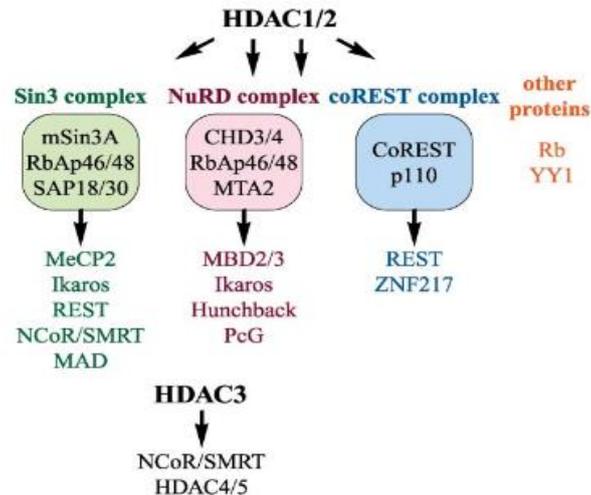


FIGURE 25 : Complexes multiprotéiques répresseurs de la transcription impliquant les KDACs de classe I (Grozinger et Schreiber 2002).

Les complexes Sin3, Mi2/NuRD et CoREST se composent de multiples sous-unités dont font partie HDAC1 et HDAC2. Le complexe N-CoR/SMRT comporte 7 sous-unités dont HDAC3.

Les KDACs sont également sujettes aux modifications post-traductionnelles et on dénombre plusieurs sites de phosphorylation. Elles peuvent aussi être acétylées, ubiquitinées, nitrosylées, SUMOylés ou carbonylées, (Chiocca et Segré 2011). Ces modifications vont moduler leur activité catalytique, leur localisation et leur association à leurs partenaires.

L'activité enzymatique des HDAC 1, 2 et 3 nécessite leur association avec des complexes (represseurs de la transcription) multiprotéiques (Figure 25). En effet, HDAC1 et 2 ne se lient pas directement à l'ADN et sont sans doute inactives en l'absence de leurs partenaires. Ainsi le complexe dont elles font parties, va dicter le contexte fonctionnel dans lequel elles vont agir. Les complexes contenant HDAC1 et 2 les mieux caractérisés sont les complexes Sin3A, NuRDandCoREST. HDAC3 quant à elle, est associée au complexe NCoR/SMRT.

Class	Member	Localization	Substrate	Function
I	HDAC1	Nucleus	Histones, MEF2, E2F1, p130, c-JUN, MKP1, p53, AMPK, p21, YY1, NF-κB, NOS, c-MYC, SMAD, pRb, SP1/SP3, TSHZ3, Myo-D, GATA, PCNA	Cell cycle progression, proliferation, differentiation, development, cancer.
	HDAC2	Nucleus	Histones, NF-κB, SRF, GATA, p53, PKC-δ, pRb, Ku70, CIITA, HSP70	Cell proliferation, development, synaptic plasticity, cardiac hypertrophy
	HDAC3	Nucleus/cytoplasm	Histones, MKP1, E2F1, NOS, MR, NKX2.5, p300, MCP, PCAF, NF-κB, pRb, YY1, HSP70, PPAR-γ	Cell proliferation, cell cycle control, development
	HDAC8	Nucleus	Histones, HSP70, SMC3,	Smooth muscle differentiation and contractility,

FIGURE 26 : Tableau récapitulatif des différents substrats histones et non histones et fonctions des KDACs de classe I (Wang et al. 2015).

HDAC8 est très différente des autres KDACs de classe I. Bien qu'elle possède un NLS au centre de sa séquence protéique, elle est constituée essentiellement du domaine catalytique (*Figure 24*). De plus, comme les autres KDACs de cette classe, elle peut fixer le Zn^{2+} et le Fe^{2+} (*Gantt et al. 2006*). Nous reviendrons par la suite sur la protéine HDAC8 humaine et nous décrivons en détails sa structure, son mode d'action ainsi que les fonctions biologiques dans lesquelles elle est impliquée (*Cf : Partie III*).

❖ La classe IIa et IIb :

La classe II est divisée en deux sous-classes : la classe IIa comprend HDAC4, 5, 6, 7 et 9 et la classe IIb regroupe HDAC6 et HDAC10.

En plus de leur domaine catalytique, les KDACs de classe IIa sont caractérisées par une large extension amino-terminale sujette à la phosphorylation permettant de réguler leur distribution nucléo-cytoplasmique (*Figure 27*). Elles possèdent également une séquence d'adressage au noyau et un domaine de fixation au facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2). L'état de phosphorylation de ces enzymes va déterminer leur localisation et par conséquent, leur capacité à agir comme co-répresseurs transcriptionnels dans le compartiment nucléaire. Ainsi, les KDACs de classe IIa non phosphorylées resteront dans le noyau, et se lieront à la chromatine pour réprimer la transcription. Elles sont exprimées de manière tissu-spécifique et exercent leur fonction de répresseur transcriptionnel dans le muscle squelettique, cardiaque et lisse, l'os, le système immunitaire, le système vasculaire et le cerveau. Par ailleurs, des études utilisant des souris KO pour chaque KDAC de classe IIa ont mis en évidence des défauts importants dans la différenciation cellulaire et dans les processus de développement. Il a été montré que les souris KO pour HDAC5 et/ou HDAC9 présentaient une hypertrophie cardiaque exacerbée en réponse à un stress induit par une sténose aortique. De même, chez des souris déficientes en HDAC4, on observe une calcification osseuse prématurée et les souris KO pour HDAC7 présentent un défaut de formation des jonctions serrées au niveau du système circulatoire en développement, induisant une létalité pour l'embryon.

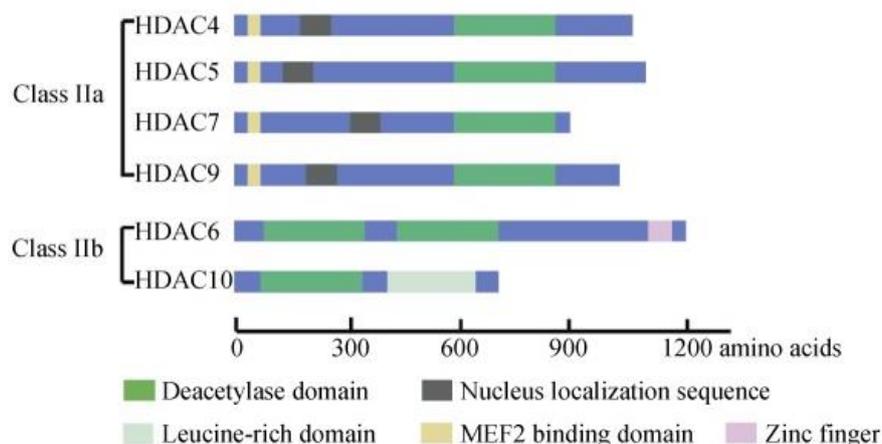


FIGURE 27 : Organisation des domaines fonctionnels des KDACs de classe IIa et IIb (*Wang et al. 2015*)

Parmi les substrats identifiés des KDACs de classe IIa, on retrouve les protéines 14-3-3 qui sont les substrats de HDAC4, 5 et 9. Pour HDAC4, nous pouvons donner l'exemple de p53 ou encore le facteur de transcription FoXO (*Figure 28*) (*Wang et al. 2015*).

Contrairement aux membres de classe IIa, HDAC6 contient deux domaines désacétylases en tandem DD1 et DD2 et un doigt de zinc en position C-terminale. Le motif en doigt de zinc peut lier l'ubiquitine et est appelé domaine ZnF-UBP ou domaine BUZ (Binding-of-Ubiquitin Zinc). Elle est majoritairement cytoplasmique et cible l' α -tubuline, la cortactine et la protéine Hsp90 d'où sa fonction dans des processus cellulaires tels que l'adhésion ou encore la motilité cellulaire.

L'autre membre de la classe IIb est HDAC10. Elle est retrouvée dans le noyau et le cytoplasme. HDAC10 possède une séquence N-terminale qui est hautement similaire au premier domaine désacétylase de HDAC6, tandis que la partie C-terminale est riche en leucine (*Figure 28*). À ce jour, aucun orthologue n'a été décrit chez les invertébrés et très peu de choses sont connues sur sa fonction biologique.

Class	Member	Localization	Substrate	Function
Iia	HDAC4	Nucleus/cytoplasm	(Partners)Histones, MEF2, MyoD, p21, NFAT, Runx2, SRF, MRJ, p53, STAT1, FOXO, CAMTA2,HP1,14-3-3,	Cellular hypertrophy suppression, bone development, neuron survival and development,
	HDAC5	Nucleus/cytoplasm	(Partners)Histones, MEF2, MyoD, YY1, SRF, NKX2.5, CAMTA2, Runx2, FGF2, FOXO, HP1, 14-3-3	Cellular hypertrophy suppression, bone development, axonal regeneration
	HDAC7	Nucleus/cytoplasm	(Partners)Histones, MEF2, MyoD, MMP10, HIF2 α , Nur77, 14-3-3, CAMTA2	Cell survival, vascular development,immunomodulation
	HDAC9	Nucleus/cytoplasm	(Partners)Histones, MEF2, MyoD, FOXP3, 14-3-3, CAMTA2	Neuron development, synaptic plasticity,Immunomodulation
IIb	HDAC6	Cytoplasm	α -tubulin, HSP90, Prx1, Prx2	Cytoskeletal dynamics, cell motility,

FIGURE 28 : Tableau récapitulatif des différents substrats et des fonctions des KDACs de classe IIa et IIb (*Wang et al. 2015*).

❖ La classe IV :

Décrit pour la première fois en 2002, HDAC11 est le plus petit membre de la famille des KDACs (*Figure 29*). En effet, cette protéine de 347 acides aminés est constituée principalement du domaine catalytique qui présente des résidus conservés avec les KDACs de classe I et II.

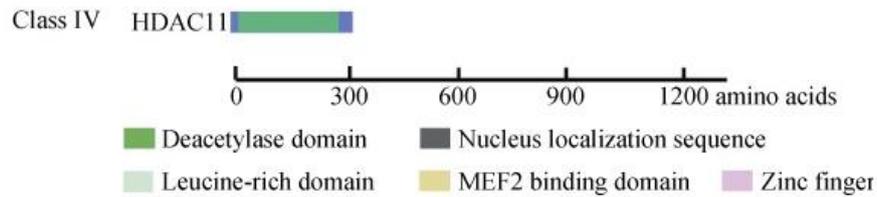


FIGURE 29 : Structure de la protéine HDAC11 (Wang et al. 2015).

Bien que majoritairement nucléaire dans les cellules HEK293, HDAC11 a également été détectée dans le cytoplasme des lymphocytes T CD4⁺ (Keedy et al. 2009), suggérant que la localisation intracellulaire de HDAC11 varie selon les types cellulaires. Elle est exprimée dans les reins, le cœur, le cerveau, les muscles squelettiques et les testicules (Gao et al. 2009). Elle est également présente dans les cellules hématopoïétiques (Villagra et al. 2009). De plus, elle n'interagit pas avec les interactants classiques des KDACs de classes I et II comme N-COR, SMART ou RbAp48 (Gao et al. 2002), mais elle semble néanmoins se lier à HDAC6.

La caractérisation de l'interactome des lysines désacétylases humaine a permis d'identifier plusieurs partenaires d'HDAC11 parmi lesquels nous pouvons citer les protéines DICER1, HJURP ainsi que les membres du complexe cohésine suivants : SMC1, SMC3, STAG1 et SMC4 (Joshi et al. 2013).

2- Les KDACs NAD⁺ dépendantes

Les KDAC de classe III aussi appelées sirtuines ont leur l'activité désacétylase contrôlée par le rapport cellulaire [NAD⁺] / [NADH]. La protéine Sir2 (Silent Information Regulator 2) de levure fut la première sirtuine identifiée. Ces enzymes sont retrouvées chez les eucaryotes comme chez les procaryotes et se divisent en cinq sous-classes (I-IV et U). Les classes I et IV sont subdivisées respectivement en trois et deux sous-groupes. Quant aux sirtuines de classe U, on ne les trouve que chez les bactéries Gram-positives. Chez *S. cerevisiae*, cinq sirtuines ont été identifiées : Sir2p ainsi que Hst1 à 4 (Homologs of sir two) alors que le génome humain ne code que pour sept protéines : Sirt1 à 7 (Blander et Guarente 2004).

Les sirtuines sont organisées en deux domaines globulaires bilobés, un petit et un grand domaine. Le grand domaine dit de *Rossmann fold* est constitué de six feuillets β parallèles (β 1- β 3 et β 7- β 9) entourés de huit hélices α (α 1, α 2, α 6, α 7 et α 9- α 12) (Figure 30). Il est à noter que les protéines Sirt2 et Hst2p de levure ont chacune une hélice α supplémentaire, α 13, qui viendra se loger à l'extérieur du grand domaine (Figure 30). Une séquence Gly-X-Gly conservée essentielle à la liaison au phosphate du NAD⁺ et aux résidus chargés responsables de la liaison aux groupes riboses est également retrouvée. Le petit domaine provient de deux insertions dans le domaine *Rossmannfold*, qui forment ensemble un seul domaine globulaire. La première insertion comprend trois

INTRODUCTION

hélices α (α_3 , α_4 et α_5) qui se replient pour former le module hélicoïdal et la seconde lie l'ion zinc (Finnin et al. 2001). Un site de liaison aux substrats acétylés et au NAD⁺ se trouve à l'interface des deux domaines, reliés entre eux par deux boucles flexibles (L1 et L2) (Figure 30). Une troisième boucle (L3) participe également à la formation de ce site et à la stabilisation de l'interaction aux substrats acétylés.

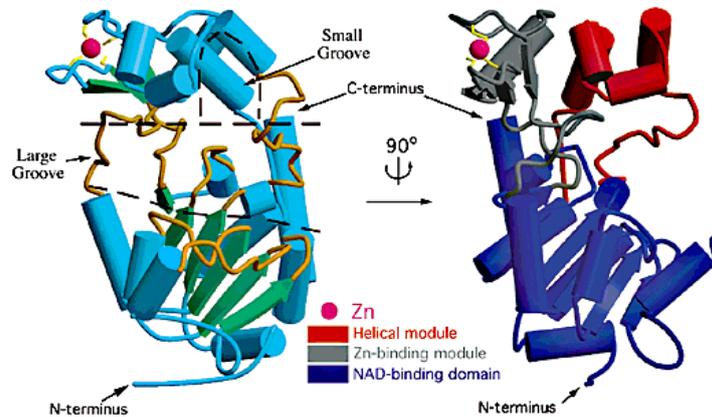


FIGURE 30 : Structures tridimensionnelles des sirtuines (Finnin et al. 2001).

Le domaine Rossmann fold est indiqué en bleu, le petit domaine de fixation de l'ion zinc, en gris. L'ion Zn²⁺ est en rouge

Sirt1 est l'enzyme qui présente la plus forte homologie avec la protéine de levure Sir2. Elle est capable de désacétyler H4K16 (Hajji et al. 2010), H3K14 ainsi que H1K26 (Langsfeld et al. 2015) qui est impliquée dans la mise en place de variants d'histones.

Les rôles biologiques de Sirt1, sont multiples du fait de ses nombreux substrats, qui peuvent être classés en différentes catégories (Yang et al. 2015) : (1) les facteurs de transcription comme p53, FoXO1, FoXO3a, NF- κ B, c-MYC, N-MYC, E2F1 et HIF-1 α / HIF-2 α , qui vont réguler la progression du cycle cellulaire et favoriser la survie cellulaire; (2) les protéine impliquées dans le réparation de l'ADN Ku70, RAD51, NBS1, APE1 et WRN; (3) les récepteurs nucléaires et facteurs associés LXR, FXR, ER α , AR, PPAR γ , PGC1 α , CLOCK et PER2, impliqués dans la régulation du métabolisme; (4) les enzymes modifiant les histones SUV39H1, p300, TIP60 et PCAF; (5) et les molécules de signalisations cellulaires telles que STAT3, la β -caténine ou encore SMAD7.

La protéine Sirt2 est majoritairement cytoplasmique et son substrat le plus connu est la tubuline. En effet, elle désacétyle la lysine 40 de l' α -tubuline, résidu qui est également la cible de HDAC6. Sirt2 et HDAC6 sont retrouvées le long des microtubules et peuvent être co-immunoprécipitées, suggérant que ces deux protéines régulent de façon coordonnée le niveau d'acétylation de la tubuline (North et Verdin 2004). Il a aussi été démontré que l'enzyme jouait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, son expression augmente avant l'entrée en mitose des cellules et la surexpression de l'enzyme induit une augmentation de la durée de la phase M (Dryden et al. 2003). Le rôle de Sirt2 dans la pathogenèse du cancer a également été mis en évidence. Les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine Sirt2 sont fortement réduits dans une grande partie des

INTRODUCTION

lignées de gliomes humains et l'expression ectopique de la protéine dans ces lignées cellulaires induit une modification du réseau des microtubules (*Inoue et al. 2007*).

Sirt3 est localisée dans la matrice mitochondriale et possède une activité ADP ribosyltransférase. Elle est aussi détectée dans le noyau, où elle est capable de désacétyler H4K16 (*Vaquero et al. 2007*) pour réprimer la transcription. Dans les mitochondries, Sirt3 régule le métabolisme, l'homéostasie énergétique, la thermogénèse et la biogénèse mitochondriale (*Schwer et al. 2002 ; Schwer et al. 2002*). En résumé, Sirt3 augmente la β -oxydation des acides gras en désacétylant et donc en augmentant l'activité de l'AcCoA (Acyl CoA Dehydrogenase). En outre, elle régule plusieurs composants du cycle de Krebs et de la chaîne de transport des électrons pour favoriser la production d'ATP. Chez les souris KO pour *sirt3*, ceci se traduit par des taux réduits d'ATP cellulaire ainsi qu'une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) au sein de la cellule, entraînant ainsi des dommages à l'ADN et aux protéines, et indirectement le développement de cancer (*Shi et al. 2005*).

Sirt4 est une ADP-ribosyltransférase mitochondriale sans activité désacétylase reconnue. Elle est impliquée dans la régulation des fonctions métaboliques des cellules. *In vitro*, Sirt4 peut ADP-ribosyler les histones ainsi que la protéine GDH (Glutamate DésHydrogénase). Par ailleurs, *Haigis et al. (2006)* ont montré qu'en inhibant l'activité catalytique de la GDH, Sirt4 jouait un rôle dans la régulation de la sécrétion de l'insuline des cellules β du pancréas.

Sirt5 est également une enzyme mitochondriale qui possède une faible activité désacétylase. Le substrat le mieux étudié de Sirt5 est la CPS1 (Carbamoyl Phosphate Synthétase 1). Cette protéine est impliquée dans la synthèse de l'urée et son activité est nécessaire à l'élimination de l'ammoniac généré par le métabolisme des acides aminés. Plusieurs études ont démontré que Sirt5 était capable de désacétyler et donc d'activer CPS1 favorisant ainsi la production d'urée et l'élimination de l'ammoniac excessif de la cellule. Les souris KO pour *sirt5*, présentent des taux élevés d'ammoniac après un jeûne prolongé, ce qui suggère que cette enzyme aide le foie à gérer les sous-produits du métabolisme des acides aminés.

Sirt6 est une protéine possédant une faible activité désacétylase, *in vitro* ainsi qu'une activité ADP-ribosyltransférase. Elle est étroitement liée à la chromatine puisqu'elle désacétyle H3K9 (*Kawahara et al. 2009*) et H3K56 (*Cai et al. 2016*). Elle est impliquée dans divers processus biologiques tels que la réparation de l'ADN, l'inflammation et le métabolisme du glucose et des lipides. Les souris déficientes en Sirt6 présentent d'ailleurs d'importantes anomalies (hypoglycémie sévère, faibles taux sériques d'IGF-1, perte de graisse sous-cutanée, colonne vertébrale incurvée ...) induisant la mort des souris vers l'âge d'un mois (*Mostoslavsky et al. 2006*).

Sirt7 régule l'expression de gènes codant pour l'ADN ribosomique *via* sa liaison avec l'ARN polymérase I. Elle est également capable de désacétyler p53 *in vitro* et *in vivo*, et il a été montré que la délétion de *sirt7* augmentait l'apoptose médiée par p53. Par ailleurs, une surexpression de Sirt7 a été observée dans les cancers du sein, de la thyroïde et du foie

C. Inhibiteurs de KDACs et thérapies anticancéreuses

Les modifications de la balance acétylation/désacétylation peuvent être responsables de changements dans le profil d'expression des gènes modifiant ainsi certaines voies de signalisation telle que la voie ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) et Wnt (Wingless/Int-1). De plus, ces perturbations affectent la dégradation des protéines par le protéasome ou encore modifier l'activité de différentes protéines. De ce fait, les KDACs sont très étudiées en tant que cibles thérapeutiques et ce, dans de nombreuses maladies telles que les cancers ou dans le cas de certaines maladies neurodégénératives et désordres immunitaires (*Falkenberg et Johnstone 2014*).

Certains inhibiteurs de KDACs sont capables d'agir spécifiquement contre une seule classe d'enzymes (inhibiteurs sélectifs), mais plus fréquemment contre toutes les KDACs (*pan*-inhibiteurs) (*Eckschlagler et al. 2017*). Les différents inhibiteurs de KDACs peuvent être catégorisés en cinq classes : **(i)** les acides hydroxamiques (hydroxamates); **(ii)** les dérivés aliphatiques; **(iii)** les benzamides; **(iv)** les tétrapeptides cycliques; et **(v)** les inhibiteurs des sirtuines.

Les acides hydroxamiques **(i)** sont efficaces sur les classes I et II de KDACs. La trichostatine A (TSA), qui à l'origine est un antibiotique antifongique est un inhibiteur utilisé exclusivement en laboratoire en raison de sa toxicité. En revanche, aux Etats-Unis, d'autres hydroxamates comme le SAHA (acide suberoylanilide hydroxamique ou Vorinostat) ont déjà été approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement du lymphome cutané à cellules T (CTCL). De même, le Bélinostat et le Panobinostat sont également approuvés respectivement dans le traitement du lymphome T périphérique (PTCL) et du myélome multiple. Parmi ce groupe d'inhibiteurs, certains sont sélectifs pour la classe II des KDACs comme le Rocilinostat ou pour les classes I, II et IV ; c'est le cas du Practicinostat.

Les dérivés aliphatiques **(ii)** comme l'acide valproïque (VPA), l'acide butyrique et l'acide phénylbutyrique, sont connus pour être capable d'inhiber les KDACs de classe I et II. La VPA est utilisé dans le traitement de l'épilepsie, des troubles bipolaires et des migraines, et est en cours d'études cliniques en tant que médicaments anticancéreux en association avec d'autres dérivés aliphatiques.

Parmi les benzamides **(iii)** qui sont actuellement testés dans des études cliniques, l'Entinostat, la Tacedinaline et 4SC202 inhibent les KDACs de classe I. Le Mocétinostat quant à lui est un inhibiteur sélectif des KDACs des classes I et IV.

Les tétrapeptides cycliques **(iv)** comprennent la Romidepsine et le Depsipeptide qui sont deux molécules approuvées par la FDA et l'EMA (European Medicines Agency) pour traiter le CTCL. Le dernier groupe d'inhibiteurs **(v)** comprenant la Nicotinamide qui est sélectif de la classe des sirtuines ainsi que le Sirtinol et

Cambinole sélectifs pour Sirt1 et Sirt2.

Les inhibiteurs d'KDACs induisent l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation des cellules, ce qui leur confère par conséquent une propriété anticancéreuse intéressante (Figure 31). Ils réduisent également l'angiogénèse et modulent la réponse immunitaire. Ces effets ne sont cependant pas uniformes et peuvent varier en fonction du type de cancer, de la sélectivité de l'inhibiteur et de la dose. La VPA, par exemple, va inhiber la prolifération des cellules cancéreuses de la vessie et peut induire l'arrêt du cycle cellulaire de certaines lignées de neuroblastomes (Stockhausen et al. 2005). Cependant, aucun effet n'a été observé sur des cellules cancéreuses de la prostate (Chen et al. 2006).

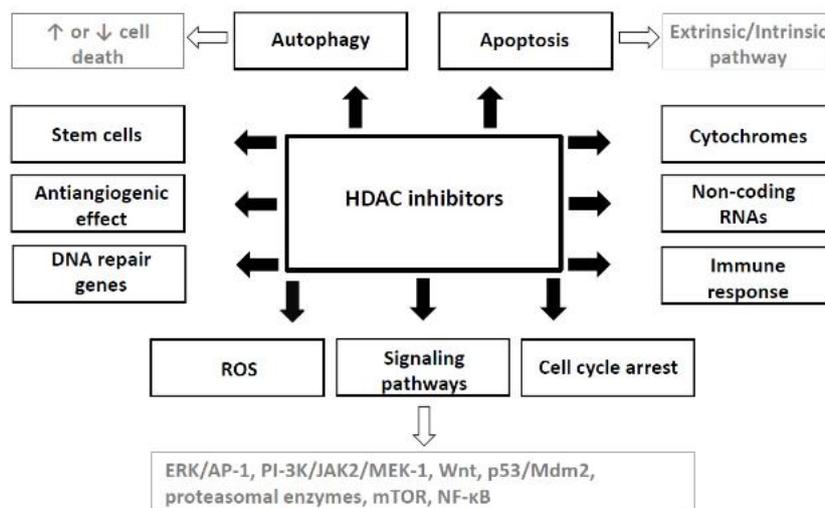


FIGURE 31 : Mécanismes cellulaires ciblés par les inhibiteurs de KDACs (Eckschlager et al. 2017).

Pour finir, il a été démontré que l'utilisation concomitante d'inhibiteurs de KDACs avec d'autres molécules inhibitrices d'acteurs épigénétiques pouvait potentialiser leurs effets. Par exemple, l'association de la VPA et de la Décitabine, qui est un inhibiteur d'ADN méthyltransférases, induit l'apoptose et augmente leurs effets inhibiteurs *in vitro* et *in vivo* sur des cellules leucémiques. De même, il a été montré que l'association TSA-Décitabine permet d'augmenter l'apoptose dans des lignées cellulaires cancéreuses de prostate, de pancréas ou encore de poumon. Des effets positifs ont également été rapportés en combinant des inhibiteurs de KDACs et d'agents générateurs de ROS, des inhibiteurs de protéasome, d'agents endommageant l'ADN (inhibiteurs de topoisomérases, intercalants d'ADN...) (Eckschlager et al. 2017).

D. Les KDACs chez les schistosomes

L'étude des mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'expression des gènes au cours du développement du parasite *S. mansoni* a permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs acteurs dont les lysines désacétylases ou KDACs. Les KDACs sont des enzymes bien conservées dans le règne du vivant. Chez

les eucaryotes, nous avons vu qu'elles étaient réparties en 4 classes ; les classes I, II et IV ont une activité dépendante des ions Zn^{2+} , tandis que la classe III est composée des sirtuines, dépendantes du NAD^+ . Leurs implications dans le développement de nombreux cancers et dans un certain nombre de maladies parasitaires font d'elles des cibles thérapeutiques intéressantes, motivant ainsi nos travaux sur l'identification et la caractérisation des KDACs chez le schistosome.

Les précédentes recherches de l'équipe ont permis de mettre en évidence trois KDACs de classe I chez *S. mansoni* : HDAC 1, 3 et 8 (Oger *et al.* 2008). Elles sont exprimées à tous les stades parasitaires et les résidus essentiels à l'activité désacétylase et à la liaison aux inhibiteurs sont conservés. De plus, il a été démontré que la protéine SmHDAC1 agissait, au même titre que son homologue humaine, comme un represseur transcriptionnel dont la fonction est dépendante de son activité désacétylase (Oger *et al.* 2008).

Concernant les sirtuines, cinq enzymes ont été caractérisées chez *S. mansoni* (Lancelot *et al.* 2013). L'analyse phylogénétique des sirtuines a montré d'une part que les enzymes de *S. mansoni* se regroupaient avec leurs orthologues eucaryotes au sein des 4 classes de sirtuines et d'autre part que le parasite ne possédait pas d'orthologue de Sirt3 et Sirt4. Les sirtuines sont également présentes tout au long du cycle puisque les transcrits ont été détectés chez les cinq stades parasitaires. De plus, l'inhibition des enzymes par des inhibiteurs tels que le Sirtinole et la Salermide induit la mort des schistosomules par apoptose et semble impacter significativement l'appariement des vers adultes et donc la ponte (Lancelot *et al.* 2013).

Des examens par microscopies confocales réalisées sur des vers adultes traités à la Salermide démontrent un effet de la molécule sur les organes reproducteurs des deux sexes du parasite. En effet, une réduction importante du nombre de cellules germinales dans les testicules du mâle et une désorganisation des ovaires avec une diminution du nombre d'oocytes immatures, ont été observés. L'interférence des transcrits codant pour SmSirt1 par ARNi réalisée chez des vers adultes semble également induire une modification des ovaires de la femelle similaire à celle obtenue par le traitement à la Salermide (Lancelot *et al.* 2013).

L'utilisation d'inhibiteurs non sélectifs de KDACs a également démontré qu'il était possible d'induire l'apoptose et la mort des parasites suggérant ainsi que les KDACs sont essentielles à la survie du parasite (Dubois *et al.* 2009). En effet, le traitement de schistosomules *in vitro*, par la TSA, la VPA (acide valproïque) et par le SAHA induit la mort des larves de façon dose-dépendante (Dubois *et al.* 2009). La TSA semble également provoquer une hyperacétylation de l'histone H4 et donc une augmentation de l'expression de gènes tels que ceux codant pour les caspases 3 et 7.

Au cours du projet européen SetTReND (Schistosoma Epigenetics-Targets, Regulation, News Drugs), l'équipe est parvenue à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques chez *S. mansoni* en se focalisant sur les enzymes modifiant les histones ou HME (Histone-Modifying Enzymes) dans le but de développer des inhibiteurs sélectifs de KDACs. De plus, l'analyse *in silico* du génome de *S. mansoni*, a permis d'identifier plusieurs KATs, HMTs (Histones MéthylTransférases) et déméthylases.

INTRODUCTION

Dans la continuité de ce premier projet européen, le projet A-ParaDDisE (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics) a eu pour objectif de développer un certain nombre d' « epi-médicaments » candidats pour lutter contre quatre parasitoses. La méthode utilisée a consisté à tester l'efficacité et la toxicité de composés *in vitro* et *in vivo* sur les organismes responsables de la schistosomiase, du paludisme, de la trypanosomiase et de la leishmaniose.

Ces différents travaux ont également permis de décrire et caractériser la structure de la protéine HDAC8 de *S. mansoni* (SmHDAC8), cible majeure des projets SetTreND et A-ParaDDisE. Ainsi, nous avons pu initier, le développement des premiers candidats médicaments parmi lesquels certains présentent une importante spécificité pour l'enzyme parasitaire.

PARTIE III

L'histone désacétylase 8

L'histone désacétylase 8 est une KDAC de classe I qui, au vu de ses propriétés structurales et fonctionnelles, semble bien différente des autres membres de sa classe. Dans cette partie nous décrivons en détail la structure particulière de l'enzyme humaine ainsi que ses différentes fonctions biologiques et son implication dans diverses pathologies. Nous comparerons également les caractéristiques de la protéine humaine à celles de la protéine HDAC8 de *S. mansoni* afin de mettre en évidence en quoi et pourquoi, l'enzyme parasitaire constitue une cible thérapeutique intéressante.

A. Généralités

1- Structure

C'est en 2000 que *Buggy et al.* caractérisent la protéine humaine HDAC8, l'identifiant ainsi comme un nouveau membre de la classe I des KDACs. C'est une protéine de 377 acides aminés avec un poids moléculaire de 42kDa dont le gène est situé sur le chromosome X à la position q13. HDAC8 présente 54% d'identité avec HDAC1 et HDAC2, et 39% avec HDAC3. L'analyse phylogénétique des KDACs chez les eucaryotes a également montré une importante divergence d'HDAC8 suggérant qu'elle pourrait avoir subi une spécialisation fonctionnelle significative au cours de l'évolution par rapport aux autres KDACs de classe I (*Gregoretti et al. 2004*).

Elle est principalement composée du domaine catalytique qui d'un point de vue structurel est constitué de 8 feuillets β parallèles et centraux, flanqués de 11 hélices α (*Figure 32*). La boucle L1 à proximité du site actif est très flexible et peut subir des modifications conformationnelles pour s'adapter aux différents substrats.

Contrairement aux autres KDACs, HDAC8 peut lier indifféremment le Zn^{2+} et le Fe^{2+} (*Gantt et al. 2006*). Son expression est ubiquitaire et elle peut être localisée dans le noyau et dans le cytoplasme.

L'autre caractéristique qui définit HDAC8 et la distingue des autres membres de la classe I, est l'absence d'un domaine en C-terminal de 50 à 111 acides aminés, impliqué dans la localisation de la protéine et dans la modulation de l'activité enzymatique (*Figure 32*). De plus, l'activité désacétylase des KDACs de classe I est régulée par des nombreuses modifications post-traductionnelles qui ont lieu au niveau de cette extension C-terminale telles que la sumoylation (*David et al. 2002*) et la phosphorylation (*Tsai and Seto 2002*).

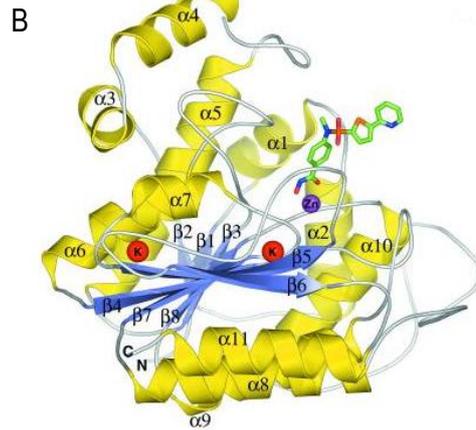
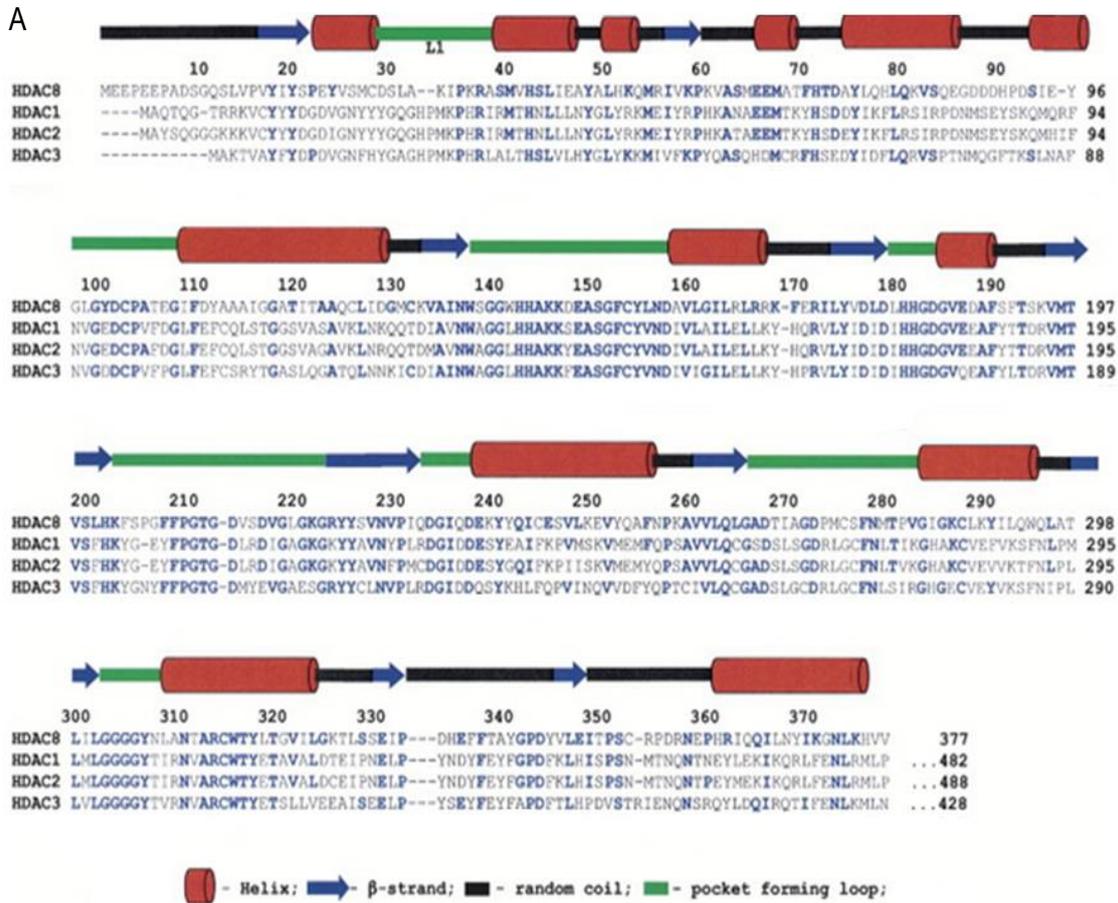


FIGURE 32 : Structure de la protéine HDAC8 humaine.

A- Alignement des séquences des KDACs humaines de classe. B- Structure tridimensionnelle de la protéine HDAC8 humaine (Vannini et al. 2004).

2- Mécanisme et régulation de l'activité d'HDAC8

HDAC8 comme toutes les autres KDAC, catalyse la perte d'un groupe acétyle au niveau des lysines cibles de ses substrats qu'ils soient des histones ou non.

Le site actif de la protéine HDAC8 humaine contient un ion métallique divalent coordonné à deux aspartates, une histidine (Asp178, Asp267 et His180) et à une molécule d'eau. La Tyr306 et les paires de résidus histidine/aspartate (His142 / Asp176 et His143 /Asp183) sont également importantes puisqu'elles sont impliquées dans les liaisons hydrogène, et vont se placer à proximité de la lysine acétylée du substrat.

Le mécanisme catalytique d'HDAC8 est montré dans la Figure 33. Dans un premier temps, l'His142 fonctionne comme une base et permet l'extraction d'un proton de l'eau liée à l'ion métallique. L'intermédiaire tétraédrique ainsi formé est stabilisé par coordination avec l'ion métallique *via* la liaison hydrogène avec la Tyr306 et les interactions électrostatiques avec des groupes chargés positivement dans le site actif. Dans une seconde étape, la dégradation de l'intermédiaire tétraédrique aboutira à la formation d'acétate et des produits désacétylés (Figure 33).

L'activité catalytique de HDAC8 semble être renforcée par un certain nombre d'ions métalliques divalents, tels que Zn^{2+} , Ni^{2+} et Fe^{2+} . Lorsque HDAC8 est purifiée dans des conditions aérobies, l'ion métallique lié est le Zn^{2+} . Cependant, la protéine recombinante purifiée par voie anaérobie à partir de bactéries *E. coli* contient 8 fois plus de fer que de zinc, ce qui confirme que l'activité enzymatique d'HDAC8 dans les lysats bactériens d'*E.coli* est sensible à l'oxygène (Gantt *et al.* 2006).

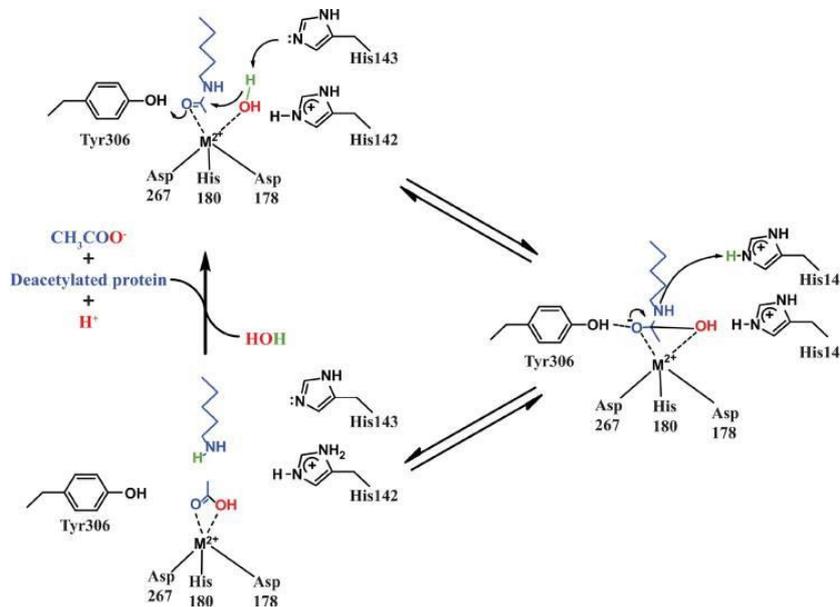


FIGURE 33 : Réaction de désacétylation réalisée par HDAC8 (Wolfson *et al.* 2013).

Le groupe acétyle de la lysine du substrat est représenté en bleu. La molécule d'eau est représentée en vert et en rouge

3- Modification post-traductionnelles

En 2004, Lee *et al.* ont montré que la protéine HDAC8 humaine était phosphorylée sur la sérine 39. En effet,

l'expression d'un mutant HDAC8 Ser39Ala dans des cellules HeLa a permis de mettre en évidence la phosphorylation de l'enzyme catalysée par la PKA. Ils ont également observé par un test *in vitro* utilisant des histones purifiées, que l'activité désacétylase de l'enzyme, extraite de cellules HeLa traitées à la forskoline, un activateur de PKA, a été réduite de cinq fois. De plus, l'activité enzymatique du mutant HDAC8 Ser39Glu, qui mime la phosphorylation, diminue de façon similaire, d'un point de vue quantitatif. Afin d'identifier les effets de la phosphorylation d'HDAC8 *in vivo*, des cellules HeLa ont aussi été transfectées avec l'enzyme puis traitées à la forskoline. Ces cellules ont montré des niveaux élevés d'histones H3 et H4 acétylées, suggérant que l'activité réduite d'HDAC8 phosphorylée entraînait une augmentation de l'acétylation *in vivo*. Ceci constitue un indice supplémentaire sur l'activité indirecte d'HDAC8 sur les histones.

Notons que la Ser39 se trouve près de la jonction avec la boucle L1 qui est impliquée dans la reconnaissance du substrat mais aussi à la surface de l'enzyme entourée de résidus hydrophobes. La phosphorylation à cette position peut donc probablement modifier les interactions enzyme-substrat en induisant une perturbation structurelle importante due à la répulsion des charges.

La phosphorylation d'HDAC8 semble également réguler les interactions protéine-protéine. En effet, dans une étude utilisant le système du double hybride bactérien, Lee *et al.* (2006) ont montré que les télomères humains 1B (hEST1B), interagissent avec HDAC8 d'une manière dépendante de la phosphorylation de la PKA. Ils ont également observé que la phosphorylation d'HDAC8 protège hEST1B contre la dégradation médiée par l'ubiquitine ligase E3 via le recrutement de Hsp70.

La plupart des KDACs sont sujettes aux modifications post-traductionnelles et dans le cas d'HDAC8 seule la phosphorylation a été mise en évidence à ce jour. Il est toutefois possible d'envisager qu'elle puisse subir d'autres modifications. En effet, l'Asn136 a été prédite comme un site potentiel de glycosylation. En outre, la Ser39 présente chez HDAC8 n'est pas conservée ni retrouvée chez les autres KDACs de classe I et HDAC8 est également la seule à être phosphorylée par la PKA.

B. Fonctions biologiques

Par les nombreux substrats et interactants qu'elle possède, la protéine HDAC8 humaine détient, au sein de la cellule, de multiples rôles (Figure 34). Les premières protéines acétylées non histones ont été mises en évidence peu de temps après la caractérisation d'HDAC8, incitant ainsi la recherche d'autres substrats des KDACs possibles.

Initialement, HDAC8 s'est avérée agir *in vitro* sur les histones H3 et H4 (Van den Wyngaert *et al.* 2000 ; Hu *et al.* 2000). D'autres études ont également montré que les lysines acétylées en position 14,16 et 20 de l'histone H4 étaient des cibles de l'enzyme (Dose *et al.* 2011) (Figure 34). Le rôle d'HDAC8 dans la catalyse de la désacétylation des histones *in vivo* reste cependant incertain. En effet, l'hyperacétylation globale des histones dans des cellules traitées par un inhibiteur spécifique d'HDAC8 n'a pas été observé (Olson *et al.* 2014),

suggérant ainsi que l'enzyme possède comme substrats cellulaires majeures des protéines non histones.

Le récepteur nucléaire, ERR α a été un des premiers substrats d'HDAC8 identifié (Figure 34)). Ce récepteur orphelin est exprimé dans de nombreux organes tels que le cœur, les reins ou encore les muscles et contrôle des processus cellulaires essentiels au maintien de l'homéostasie énergétique. Wilson et al. (2010) ont démontré qu'ERR α était acétylé par la PCAF (P300-associated factor) *in vitro* et dans le foie des souris. Ils ont également montré qu'HDAC8 interagissait directement avec le récepteur *in vivo* et que la désacétylation d'ERR α semblait augmenter l'affinité de liaison à l'ADN *in vitro*. À noter que, Sirt1 semble également être capable de désacétyler ERR α .

Un autre substrat d'HDAC8 proposé est la protéine inv(16), produit de la translocation du chromosome 16 et trouvée chez la majorité des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (Figure 34). Cette protéine de fusion combine l'extrémité N-terminale du facteur de transcription CBF β (Core Binding Factor) avec l'extrémité C-terminale de la SMMHC (Smooth Muscle Myosin Heavy Chain). Dans les cellules COS7, des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré que les protéines HDAC8 et inv(16) étaient capables d'interagir. De plus, HDAC8 semble co-localiser et interagir avec la SMMHC suggérant qu'elle serait capable d'interagir avec ce domaine chez la protéine inv(16) (Durst et al. 2003). De plus, il a été démontré qu'HDAC8 était la seule des KDACs à interagir avec la protéine de fusion. Par ailleurs cette interaction semble jouer un rôle dans la régulation d'inv(16) puisque l'ajout de TSA un inhibiteur pan-KDACs induit l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de celle-ci. Cependant des travaux récents, ont montrés que l'interaction entre CBF β -SMMHC et HDAC8 conduisait à la désacétylation et à l'inactivation ultérieure du facteur de transcription p53, qui se lie également à CBF β -SMMHC (Qi et al. 2015). Bien que la protéine inv(16) soit acétylée, elle n'a pas été retrouvée dans l'étude réalisée par Olson et al (2015).

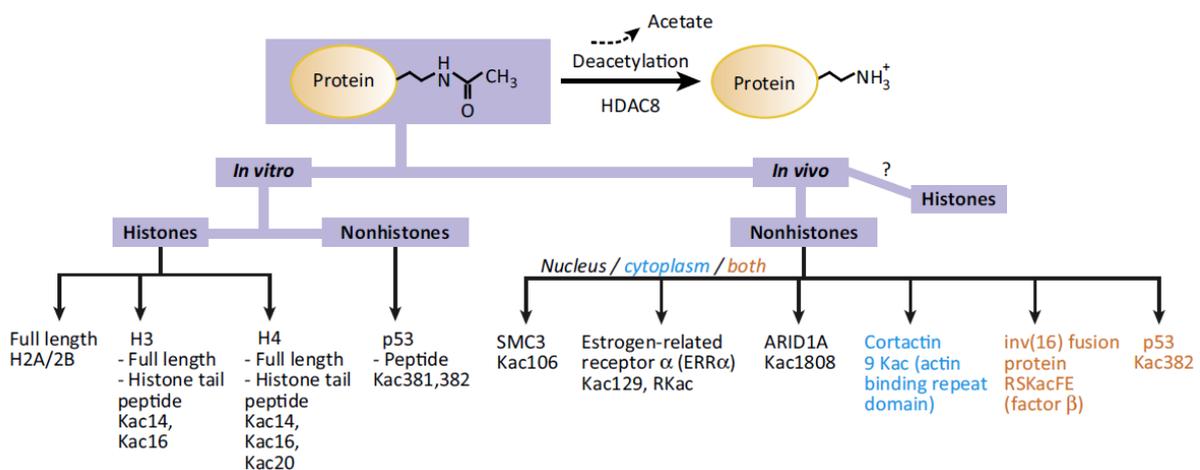


FIGURE 34 : Substrats de la protéine HDAC8 (Chakrabarti et al. 2015).

In vitro, HDAC8 peut désacétyler à la fois les histones mais aussi d'autres protéines tel que p53. *In vivo*, les protéines non histones semblent être des substrats majeurs d'HDAC8.

La protéine SMC3 (Structural Maintenance of Chromosomes protein 3) a de même été identifiée comme substrat d'HDAC8. Cette protéine qui fait partie du complexe cohésine s'avère être essentielle à la fonction de ce

complexe. En effet, le complexe cohesine, composée de SMC1, SMC3, Rad21 et des protéines STAG, forme une structure en anneau qui encercle et maintient les chromatides sœurs associées (*Figure 34*). SMC3 est acétylé sur les lysines 105 et 106 (*Figure 35*) par ESCO1/2 pendant la phase S et désacétylée par HDAC8 au cours de la télophase. L'acétylation et la désacétylation de SMC3 sont essentielles à la fonction et au recyclage de la cohesine. *Deardorff et al. (2012)* ont d'ailleurs montré que la mutation ou la délétion d'HDAC8 conduisait à l'accumulation de SMC3-Ac, pouvant induire une malformation congénitale héréditaire dominante appelée Syndrome de Cornelia de Lange (CdLS). Bien que le CdLS soit également causée par des mutations de SMC1 (~5% des cas) et SMC3 (<1% des cas), les mutations d'HDAC8 sont également responsables du développement de cette pathologie.

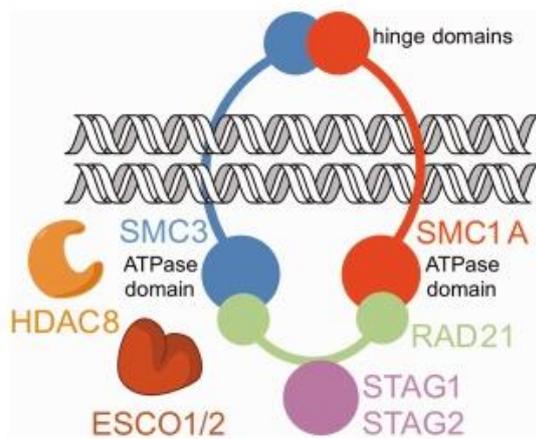


FIGURE 35 : Le complexe cohesine (*Deardorff et al. 2016*).

Le complexe cohesine est constitué de quatre composants protéiques principaux : SMC1A et SMC3 (Structural Maintenance of Chromosome proteins), Rad21 Radiation-Sensitive Mutant 21 protein et STAG1 ou STAG2 (Stromal Antigen proteins). ESCO1 et ESCO2 catalysent l'acétylation des résidus de lysine K105 et K106 de SMC3. HDAC8 catalyse la désacétylation de ces résidus de lysine pour assurer un recyclage efficace de la cohesine.

En 2015, *Olson et al* réalisent la première étude permettant d'identifier les substrats de la protéine HDAC8 humaine par spectrométrie de masse. Grâce à l'utilisation de deux inhibiteurs spécifiques d'HDAC8 (PCI-34051 et BRD3811), ils mettent en évidence des changements dans l'acétylation globale des protéines chez des cellules MCF7. Cette approche a permis d'identifier un substrat d'HDAC8 déjà connu, la protéine SMC3 qui est acétylée sur la lysine 106. Ils distinguent également comme substrat d'HDAC8, les protéines suivantes : RAI1 (Retinoic Acid-Induced protein 1), ZRANB2 (Zinc finger RAN-Binding domain-containing protein 2), NCOA3 (Nuclear receptor COactivator 3), THRAP (Thyroid Hormone Receptor-Associated Protein) ainsi que le suppresseur de tumeur ARID1A (AT-Rich Interactive Domain-containing protein 1A).

Enfin, il a été montré qu'HDAC8 pouvait interagir avec des éléments du cytosquelette tels que l' α -actine, les chaînes lourdes de myosine ou encore la cofiline (*Wolfson et al.2013*). De plus, la diminution de la capacité des cellules musculaires à se contracter, observée après leur traitement avec des siARN dirigés contre HDAC8, suggère que cette dernière participe au complexe protéique modulant le cytosquelette (*Waltregny et al. 2005*). En 2004, *Li et al.* proposent d'ailleurs qu'HDAC8 interviendrait dans la désacétylation de la cortactine dans les muscles lisses, ce qui favoriserait la polymérisation des filaments d'actine.

Pour finir, en 2013, *Joshi et al* ont également mis en évidence 15 partenaires de la protéine HDAC8 humaine qui interviennent principalement au niveau du cycle cellulaire tels que les composants du complexe cohesine SMC3

et SMC1 et STAT2 et dans le transport des protéines (ex : NUP98 (Nuclear pore complex protein) et CPNE3 (Copine-3)).

C. Rôle d'HDAC8 dans la pathogenèse cancéreuse et les infections virales.

HDAC8 est surexprimée dans de nombreux tissus cancéreux tels que le côlon, le sein, le foie, le poumon, la prostate, l'utérus, les ovaires, le pancréas, l'estomac ainsi que dans les hémopathies malignes (*Chakrabarti et al. 2015, 2016 ; Amin et al. 2017*). Elle est aussi impliquée dans d'autres types de cancers tels que le neuroblastome, le cancer urothélial, le carcinome épidermoïde et les tumeurs malignes des gaines des nerfs périphériques (MPNSTs). Dans les lignées cellulaires humaines de MPNST, la prolifération cellulaire diminue de 45% après l'interférence d'HDAC8 par siRNA. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'HDAC8 (PCI-34051, PCI-48012) semble supprimer la croissance tumorale *via* un arrêt des cellules en phase S (*Lopez et al. 2015*).

Song et al (2015) ont montré que la délétion d'HDAC8 par siRNA réduisait de manière significative l'adénocarcinome gastrique *via* l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. En outre, la suppression d'HDAC8 entraîne une augmentation de la transcription de la protéine BMF (Bcl-2-Modifying Factor) suivie d'une augmentation de l'expression de la caspase 3 et de la caspase 6.

Dans le cas des carcinomes hépatocellulaires (HCC), le KO du gène codant pour HDAC8 favorise également le mécanisme d'apoptose avec une augmentation de l'expression de protéines pro-apoptotiques (BAK, BAX et BAD) et l'amélioration de PARP et de la caspase-3. L'expression de p53 et son acétylation au niveau de Lys382 semble aussi impactées (*Wu et al. 2013*).

HDAC8 a récemment été décrite pour être impliquée dans l'entrée du virus de la grippe A et Uukuniemi *via* la modulation de l'endocytose (*Yamauchi et al. 2011*). Chez les cellules A549, le KO d'HDAC8 par siRNA affecte l'internalisation du virus et parmi les virus internalisés, seule la moitié sont acidifiés et donc capables de fusionner et de pénétrer la membrane de la cellule hôte. Ces différentes observations sont également liées à des modifications importantes de l'organisation du réseau microtubulaire cellulaire et à un changement dans le comportement des endosomes tardifs et des lysosomes. En effet, la délétion d'HDAC8 induit une désorganisation des microtubules associés aux centrosomes et une distribution anarchique des vésicules endocytaires est également observée.

D. L'Histone désacétylase 8 de *S. mansoni*

Comme nous l'avons vu antérieurement, *S. mansoni* possède trois KDACs de classe I dont SmHDAC8 qui partage avec son orthologue humaine 40% d'identité. Au niveau de la séquence protéique, des substitutions

d'acides aminés et des insertions dans la poche catalytique ont été observées (Figure 36). De plus, les transcrits codant pour SmHDAC8 sont les plus abondants parmi les KDACs de classe I et sont également exprimés à des niveaux élevés à tous les stades parasitaires. La résolution de la structure de l'enzyme, par cristallographie aux rayons X, réalisée par l'équipe du Dr. C. Romier dans le cadre du projet SetTRéND, nous a apporté de nombreuses informations sur la protéine. Comme toutes les KDACs, SmHDAC8 adopte un repliement de type arginase composé de 8 feuillets β parallèles centrés, flanqués de 15 hélices α (Figure 36 et 37A).

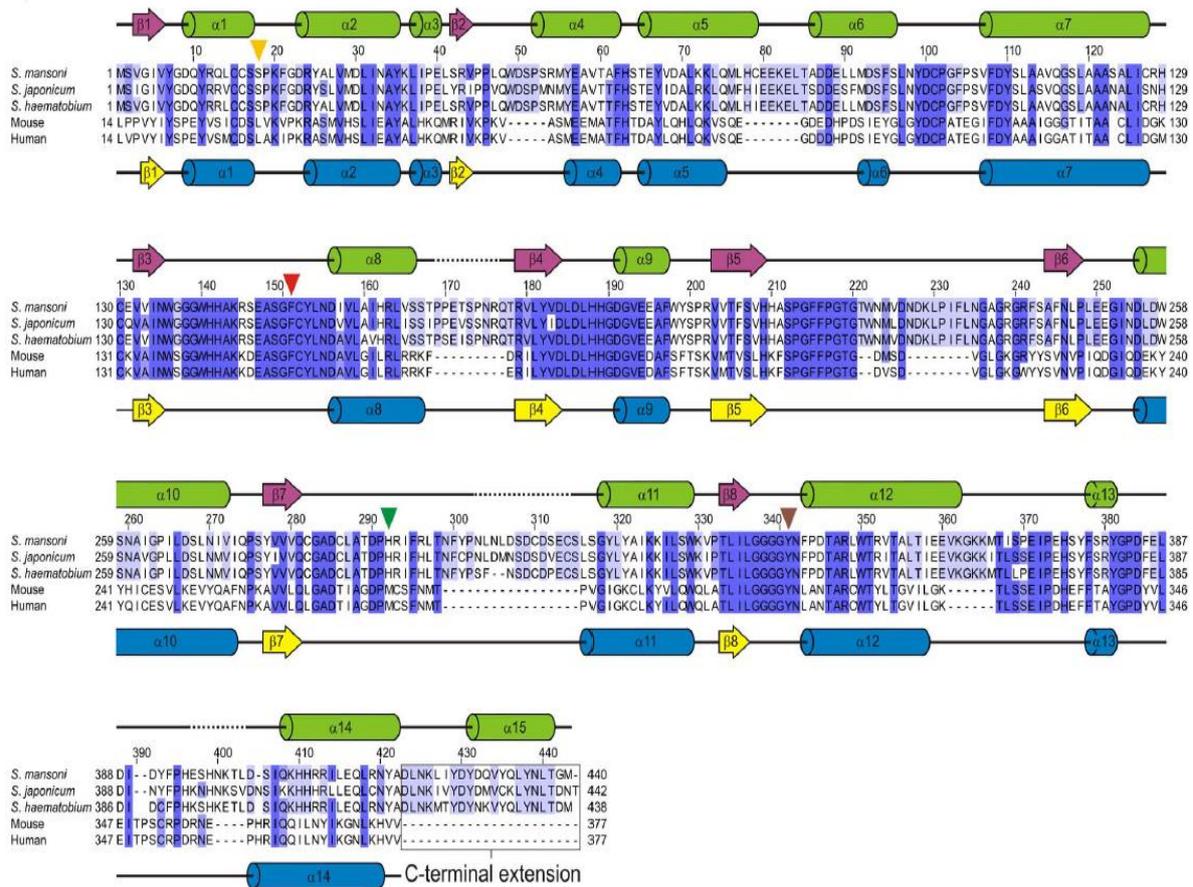


FIGURE 36 : Alignement des séquences protéiques d'HDAC8 des schistosomes, humaine et murine (Marek et al, 2013).

Les résidus conservés sont représentés en bleu. Les éléments de la structure secondaire de SmHDAC8 et la protéine HDAC8 humaine sont représentés, respectivement au-dessus et au-dessous de l'alignement des séquences.

Au niveau du site actif, la méthionine 274 chez HsHDAC8 est remplacée par une histidine en position 292 chez SmHDAC8 qui n'influence pourtant pas l'architecture de cette région (Figure 36). Toutefois, le remplacement d'un résidu hydrophobe par un résidu chargé diminue le caractère hydrophobe de la poche qui accueille normalement la partie aliphatique de la lysine acétylée du substrat. De plus, il a été montré que la mutation H292M chez SmHDAC8 n'affecte pas l'activité catalytique de l'enzyme. Ainsi la différence entre SmHDAC8 et HsHDAC8 concernerait les propriétés physico-chimiques de la protéine et non fonctionnelles. La comparaison

des sites catalytiques de l'enzyme parasite et humaine révèle également d'autres changements importants (Marek *et al.* 2013). Dans la protéine humaine, l'acide aspartique en position 101 est impliqué dans la liaison au substrat acétylé et la tyrosine 306 participe au mécanisme enzymatique. La mutation de ces résidus induit d'ailleurs une importante diminution de l'activité désacétylase de l'enzyme. Bien qu'ils soient conservés chez SmHDAC8, la tyrosine, en position 341 chez *S. mansoni*, présente un changement de conformation où le groupement hydroxyle est tourné vers le bord de la poche catalytique alors que celui de la tyrosine 306 de HsHDAC8 pointe vers l'ion métallique (Figure 37 C et D) (Marek *et al.* 2013).

Une autre différence majeure concerne la phénylalanine 151 de SmHDAC8 qui adopte également une conformation inversée de celle de l'enzyme humaine, conformation conservée chez les KDACs 8 parasites. Ces changements observés au niveau du site catalytique permettront ainsi le développement d'inhibiteurs spécifiques de la protéine parasite.

Enfin, il a été montré, dans un modèle murin, que l'extinction du transcrite de SmHDAC8, par ARN interférence (ARNi), réduisait significativement la charge parasitaire ainsi que la quantité d'œufs pondus par les vers (Marek *et al.* 2013).

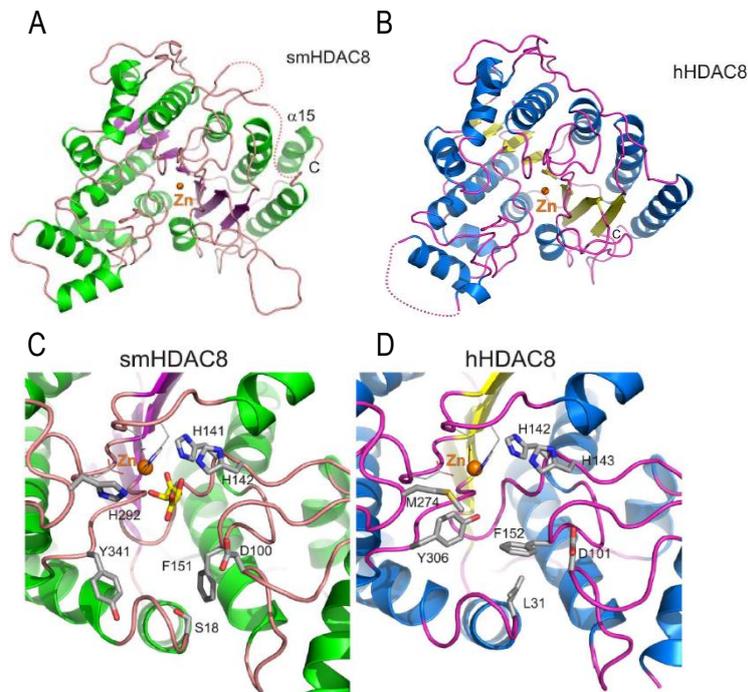


FIGURE 37 : Structure de la protéine HDAC8.

Représentations en ruban des structures de SmHDAC8 (A) et HsHDAC8 (B) et de leurs sites catalytiques (C et D). Les deux enzymes adoptent la même conformation (Marek *et al.* 2013).

Dans le cadre des projets SetTReND et A-ParaDDisE, divers molécules ciblant sélectivement SmHDAC8 ont été développées et testées sur les vers adultes et les schistosomules, et ont montré une efficacité dépendante du temps de traitement et de la dose utilisée (Stoffa *et al.* 2014 ; Kannan *et al.* 2014). Heimburg *et al.* (2016) ont d'ailleurs identifié plusieurs inhibiteurs montrant une sélectivité plus élevée pour SmHDAC8 que pour les autres isoformes (HDAC1 et HDAC6 humaines) dont certains d'entre eux présentent également une plus grande sélectivité pour l'enzyme HDAC8 parasite que pour l'enzyme humaine.

INTRODUCTION

Toutes ces données font de la protéine SmHDAC8 une cible thérapeutique intéressante. Néanmoins, bien que SmHDAC8 et HsHDAC8 soient très proches d'un point de vue structurel, les fonctions de la protéine parasitaire semblent différentes de celles de l'enzyme humaine et n'ont à ce jour pas été décrites ni même investiguées.

PARTIE IV

Les RhoGTPases

Dans le but d'identifier le rôle de SmHDAC8 dans la biologie du parasite, ses partenaires protéiques ont été mis en évidence par criblage d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) de schistosomes adultes, réalisé en double hybride chez *Saccharomyces cerevisiae* d'une part et par spectrométrie de masse après immunoprécipitation de la protéine native du parasite d'autre part. Parmi les candidats identifiés, plusieurs sont des acteurs impliqués dans la régulation de la dynamique du cytosquelette dont la GTPase SmRho1 sur laquelle nous avons porté notre attention (Cf : Résultats : Partie I ; *Caby et al. 2017*).

A. Généralités sur les RhoGTPases

Les GTPases Rho (*Ras homologous*) appartiennent à la superfamille des petites protéines G monomériques Ras (*Rat Sarcoma*). Cette superfamille, comprend plus de 150 membres qui sont extrêmement conservés chez les eucaryotes et qui se regroupent au sein de cinq familles bien distinctes (*Matozaki et al, 2000*).

- **Ras** (*Rat sarcoma viral oncogene homolog*) : impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, de la différenciation, de la prolifération et de l'apoptose.
- **Rab** (*Ras-related in Brain*) qui régulent le trafic vésiculaire intracellulaire.
- **Sar1/Arf** (*ADP ribosylation Factor*) jouent un rôle dans la régulation du trafic vésiculaire, et notamment au niveau de l'appareil de Golgi.
- **Ran** (*Ras-related in Nuclear import and export*) : participent à la régulation du transport nucléocytoplasmique et l'organisation du réseau microtubulaire lors de la mitose.
- **Rho** : participent à l'adhésion, la contractilité, la migration et la prolifération cellulaire.

Les RhoGTPases sont de petites protéines (entre 190 et 250 acides aminés) de faible poids moléculaire (entre 20 et 30 kDa). Elles présentent entre 30 et 50% d'identité de séquence avec les protéines Ras (*Wennerberg 2004*). Les premiers membres identifiés de la famille des RhoGTPases, sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Elles ont fait l'objet d'importantes recherches depuis la mise en évidence de leur rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Depuis, les études sur ces protéines ont grandement accru nos connaissances dans les mécanismes de polarisation et de migration cellulaire. Chez les mammifères, 22 gènes codant pour 25 protéines de la famille des

RhoGTPases ont été mis en évidence (Wennerberg 2004) et ces membres sont classés en neuf sous-familles (Figure 38).

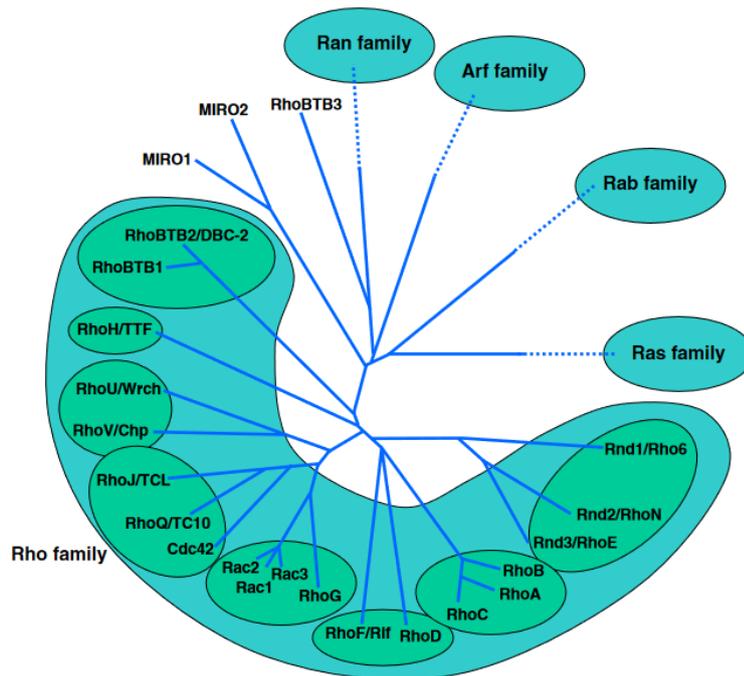


FIGURE 38 : Arbre phylogénétique de la super famille Ras de mammifères (Vega and Ridley 2008).

Les membres de la famille des RhoGTPases sont regroupés en huit sous-familles : la sous-famille Rac / RhoG, Rho, Cdc42 / RhoQ / RhoJ, RhoF / RhoD, Rnd, RhoBTB, RhoH et la sous-famille RhoU / RhoV. Les protéines Miro et RhoBTB3 forment des branches indépendantes au sein cette superfamille, distinctes des autres Rho GTPases.

1- Structure

Les RhoGTPases partagent entre 40% et 95% d'identité entre elles. Leur structure tridimensionnelle s'organise en 6 feuillets β liés par des hélices α (Figure 39). Entre le cinquième feuillet β et la quatrième hélice α , se trouve la région insert ou « insert loop », caractéristique des protéines Rho. Cette séquence de 13 acides aminés est impliquée dans l'interaction avec les protéines RhoGEFs. Wheeler et Ridley (2004) ont en effet, montré que la délétion de cette région chez RhoA pouvait induire une diminution de la stabilité de la protéine.

Les RhoGTPases sont aussi caractérisées par un domaine G présent chez tous les membres de la superfamille Ras. Ce domaine comprend 5 sites de liaison au GTP et au GDP appelés « G box » dont la séquence est hautement conservée, (Figure 40B). Le motif G1 aussi appelé boucle P ou boucle phosphate, lie les phosphates α et β du nucléotide concerné. Par ailleurs, de nombreuses études montrent que la mutation de la glycine en position 14 dans le motif G1 chez RhoA induit un changement conformationnel significatif, de cette région, ramenant ainsi la protéine à un état constitutivement actif (Ihara et al. 1998). Au contraire la mutation de la Thr19 induirait une diminution de l'affinité pour le GDP et par conséquent une forte affinité pour les GEFs. La phénylalanine 30 et la glutamine 63 semblent également essentielles à la fonction catalytique du domaine G

(Ihara et al. 1998). Les sites G4 et G5 sont plutôt impliqués dans la liaison avec la base guanine du nucléotide (Schaefer et al. 2014).

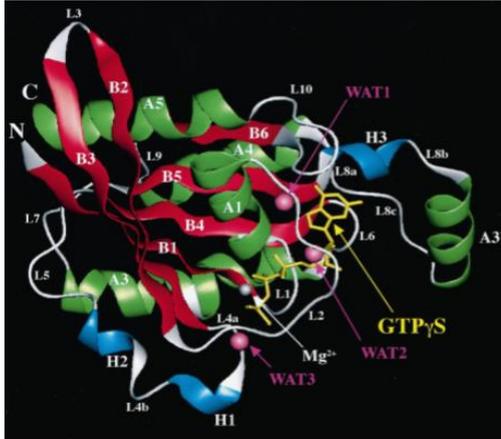


FIGURE 39 : Structure tridimensionnelle de la protéine RhoA humaine (Ihara et al. 1998).

Les feuillettes β sont en rouge, les hélices α en vert et les hélices 3₁₀ en bleu. Trois molécules d'eau (Wat : boules roses) sont également illustrées. La première molécule d'eau (Wat1) participe à la reconnaissance du GTP, la seconde (Wat2) est impliquée dans la liaison au ribose, et la dernière (Wat3) est une molécule d'eau nucléolytique putative. L'ion Mg²⁺ joue un rôle essentiel dans l'activité GTPasique de la protéine.

Les domaines Switch I et Switch II (Figure 40A) participent à l'interaction avec les régulateurs et les effecteurs des protéines Rho (Ihara et al. 1998). Ils jouent également un rôle dans la liaison avec le GDP et GTP puisqu'ils lient le groupement phosphate en γ du nucléotide.

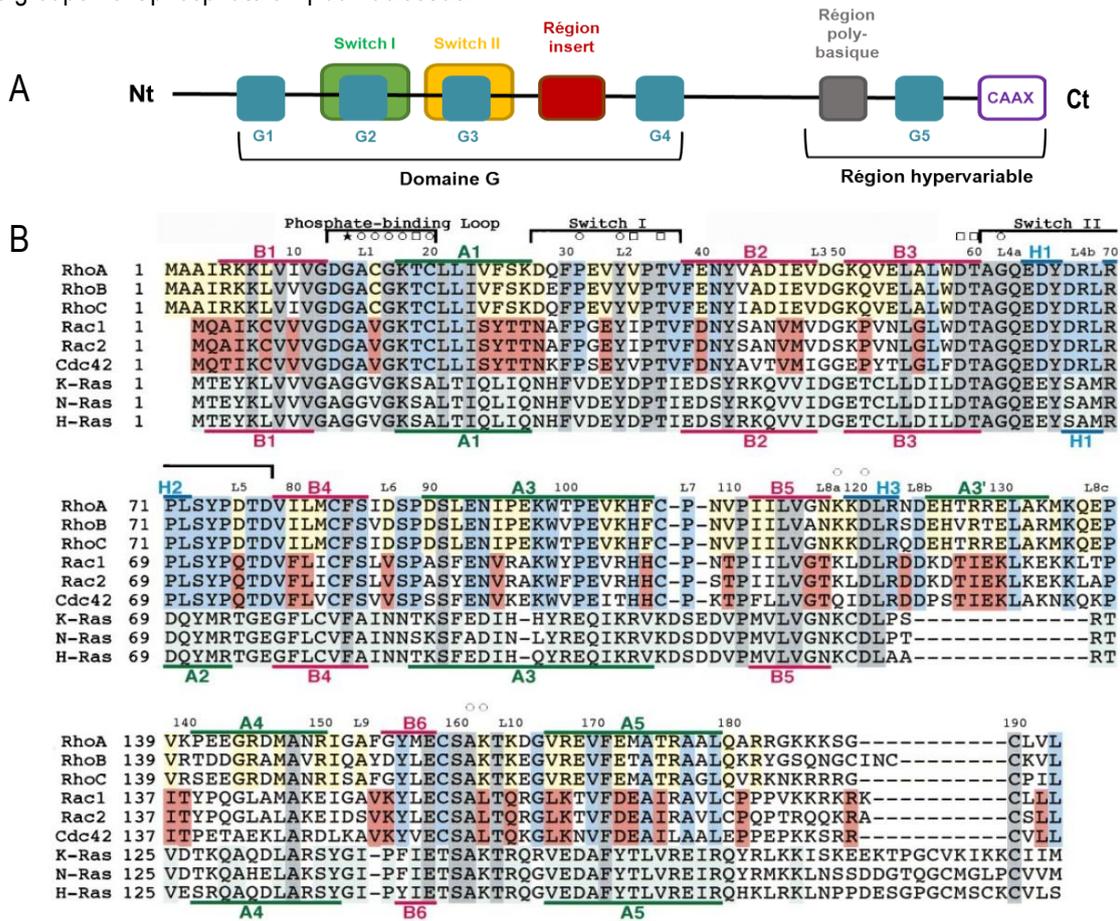


FIGURE 40 : Organisation générale des RhoGTPases.

A- Représentation schématique de la structure en domaines des RhoGTPase. Les domaines de liaison au GTP et GDP sont représentés en bleu (G1 à G5). Le site de prénylation (CAAX) est en violet. **B-** Alignement des séquences de différentes GTPases humaines. Les résidus conservés sont en jaune pour la sous-famille RhoA (RhoA, RhoB et RhoC), en rouge pour la sous-famille Rac1 (Rac1, Rac2 et Cdc42), en bleu pour RhoA. Les domaines sont indiqués le haut et en dessous des séquences alignées. Les hélices α (A1-A5) sont en vert, les feuillettes β (B1-B6) sont en rose et les hélices 3₁₀ (H1-H3) en bleu

Les différences majeures de séquence d'acides aminés entre les diverses RhoGTPases se situent dans la partie C-terminale appelée région hypervariable qui est également impliquée dans les interactions avec d'autres protéines. Les RhoGTPases sont aussi sujettes aux modifications post-traductionnelles. Elles peuvent être prénylées sur la cystéine (C) de la séquence consensus CAAX (C: cystéine ; A: acide aminée aliphatique ; X: acide aminé quelconque) présente dans l'extrémité C-terminale (Allal *et al.* 2000) (Figure 40B). Ces modifications sont essentielles à leur ancrage à la membrane de la cellule, leur permettant ainsi d'être en contact avec leurs partenaires. La région poly-basique, riche en arginines et lysines, adjacente au site G5 favorisera également la liaison des RhoGTPases à la membrane plasmique (Williams 2003).

2- Le cycle d'activation et sa régulation

Comme toutes les GTPases, les protéines Rho oscillent entre deux états conformationnellement différents : un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP. Le cycle d'activation des RhoGTPases est étroitement régulé par trois classes de protéines (Figure 41).

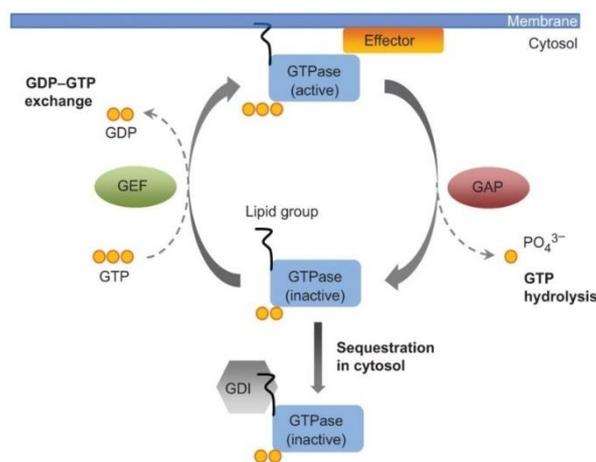


FIGURE 41 : Cycle d'activation des RhoGTPases (Bento *et al.* 2013).

Les RhoGTPases, sous leur conformation active c'est-à-dire liée au GTP, sont ancrées à la membrane *via* le groupement farnesyl ou géranylgeranyl situé en CT. Les GEFs permettent l'activation des RhoGTPases par l'échange du GDP en GTP et les protéines GAPs accélèrent l'hydrolyse du GTP en GDP. Les GDIs séquestrent les RhoGTPases dans le cytosol, mais peuvent aussi bloquer l'hydrolyse du GTP et la signalisation aux effecteurs.

Les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) vont faciliter le remplacement du GDP par le GTP générant la forme active de la protéine et lui permettant ainsi de se lier à ses effecteurs et de transmettre le signal dans la cellule. Les GAPs (GTPase-Activating Proteins) et des GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) au contraire sont des régulateurs positifs de l'activité GTPasique. Les GAPs vont permettre l'hydrolyse du GTP en GDP et les GDIs vont inhiber la dissociation du GDP de la RhoGTPase.

❖ Les RhoGEFs, comme régulateurs positifs

Comme nous avons pu le voir, les RhoGEFs permettent aux RhoGTPases de passer d'un état inactif à un état actif. Elles déstabilisent le complexe GDP-GTPase pour former un intermédiaire réactionnel sans nucléotide en interagissant avec la forme liée au GDP. Les RhoGEFs peuvent être classées en deux familles : les GEFs à domaine DH (Dbl-Homology domain) et les GEFs à domaine DHR (DOCK Homology Region).

À ce jour, 70 GEFs à domaine DH ont été répertoriés chez l'Homme, par homologie avec la protéine Dbl (Diffuse B-cell-lymphoma). Chez les mammifères, la protéine Dbl fut la première GEF isolée. Identifiée initialement comme un oncogène, elle catalyse l'échange du GTP en GDP chez la RhoGTPase Cdc42 humaine (Eva et Aaronson 1985).

Cette première famille se caractérise par la présence du domaine DH qui porte l'activité catalytique (Schmidt et Hall 2002) (Figure 42A). Ce domaine participe à la localisation membranaire de la GEF (Schmidt et Hall 2002) et lie les régions Switch des RhoGTPases. Il est associé à un domaine PH (Pleckstrin-Homology domain) adjacent qui assiste la réaction d'échange et, dans certains cas, participent à la liaison à la GTPase (Figure 42A). Le domaine PH peut également se lier aux phospholipides (Hanna and El-Sibai 2013). Notons que l'association des domaines DH-PH constitue l'unité fonctionnelle minimale nécessaire à l'activité des GEFs. D'autres domaines fonctionnels comme les domaines SH2, SH3, Ras-GEF, Rho-Gap, Ran-GEF, PDZ (domaines modulateurs des interactions protéines-protéines) sont présents (Schmidt et Hall 2002). Ils sont principalement impliqués dans le couplage de la GEF aux récepteurs en amont ou aux molécules de signalisation.

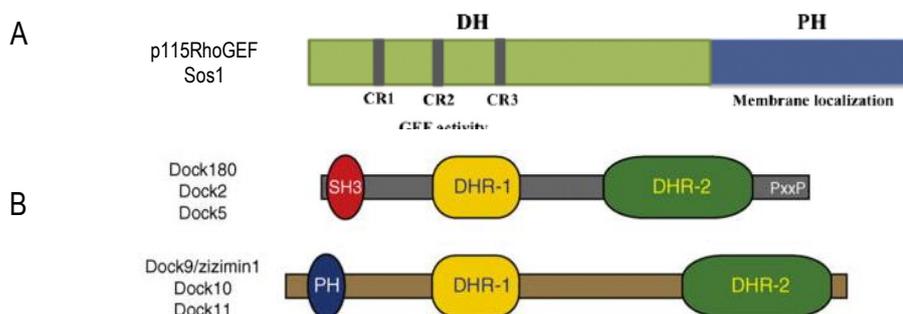


FIGURE 42 : Domaines fonctionnels des GEFs.

A-Structure des GEFs à domaine PH (Hanna and El-Sibai 2013).

B-Structure des GEFs à domaine DHR (Côté and Vuori 2007).

Les RhoGEFs, à domaine DHR ou protéines CZH pour « CDM and Zizimin Homolgy » sont au nombre de 11 et sont regroupées par homologie de séquence avec la protéine DOCK180 (Côté et Vuori 2007). DOCK180 ou DOCK1 a été mise en évidence via son domaine fonctionnel SH3, puis définie comme GEF de la RhoGTPase Rac1 (Kiyokawa et al. 1998). Les protéines de cette famille sont des GEFs atypiques puisqu'elles ne possèdent pas de domaines DH-PH, mais deux régions particulières DHR1 et DHR2 dont les séquences sont extrêmement conservées (Figure 42B). Le domaine DHR1 se lie aux phospholipides PI(3,5)P2 et PI(3,4,5)P3,

permettant l'ancrage des protéines à la membrane (Côté et al. 2005) et le domaine DHR2, quant à lui porte l'activité GEF (Figure 42B).

La spécificité des GEFs vis-à-vis des différents membres de la famille des GTPases Rho n'est pas certaine. Des protéines comme, PDZ-RhoGEF, p63RhoGEF et ARHGEF10 (pour RhoA) (Miller et al. 2014), Sos1, Sos2 et Tiam-1 (pour Rac1) (Bernards et Settleman 2007 ; Snyder et al. 2002) ou Fgd1 et Intersectin 1 (pour Cdc42) (Zheng et al. 1996 ; Snyder et al. 2002) ont une activité spécifique pour une unique GTPase. Cependant, d'autres protéines telles que Vav1 (pour Cdc42, Rac1 et RhoA) (Han et al. 1997) ou encore Dbl (pour Rho et Cdc42) sont capables de se lier à différentes GTPases (Whitehead et al. 1995).

L'activation des protéines GEFs repose sur des mécanismes généraux communs de régulation : interaction protéine-protéine ou protéine-lipide, liaison de second-messager, modifications post-traductionnelles (Figure 43). Chez les GEFs à domaine DH, le domaine PH est essentiel à la régulation de l'activité catalytique. En effet, il permet aux GEFs de se localiser à la membrane plasmique, via sa liaison aux phospholipides. De nombreuses études ont d'ailleurs montrées que le domaine PH jouait un rôle dans la localisation des GEFs Lfc (Whitehead et al, 1995) et Dbs (Whitehead et al. 1999). De plus, il a été montré que le PIP2 ou le PIP3 semblait avoir un rôle activateur ou inhibiteur sur l'activité des GEFs Vav, Dbl, ou Sos1 (Figure 43B).

L'activité des GEFs semble également sous la dépendance de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Figure 43A).

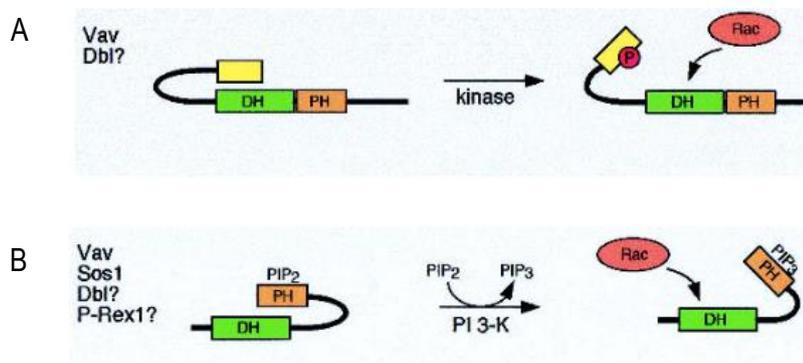


FIGURE 43 : Mécanisme d'activation des RhoGEFs (Schmidt and Hall 2002).

A- Activation des GEFs par la phosphorylation. **B-** Rôle du PIP2 dans l'activation des RhoGEFs

La GEF Vav par exemple, est activée par phosphorylation via les tyrosines kinases Src ou Lck (Crespo et al. 1997 ; Han et al. 1997 ; Bustelo 2014) en aval de son couplage à certains récepteurs tels que le TCR, BCR, EGFR, ou encore les intégrines. Les GEFs Sos1 et Sos2 (Son of Sevenless), des régulateurs de Rac, sont recrutées à la membrane plasmique via l'interaction avec la protéine Grb2. Néanmoins, si Sos est phosphorylée par Erk, cela induira sa dissociation à Grb2, l'éloignant ainsi de son lieu d'activité (Aronheim et al. 1994 ; Waters et al. 1995).

❖ Les régulateurs négatifs➤ **Les RhoGAPs**

Les protéines RhoGAPs vont stimuler la faible activité GTPasique intrinsèque des RhoGTPases permettant ainsi la conversion de la forme active liée au GTP à la forme inactive liée au GDP. La famille des protéines GAPs est très hétérogène et 80 RhoGAPs ont été répertoriées chez l'Homme (*Moon and Zheng 2003*). Les RhoGAPs présentent dans leurs séquences primaires un domaine conservé « RhoGAP » responsable de l'activité catalytique (*Figure 44*). Ce domaine de 150 acides aminés est impliqué dans l'interaction avec les domaines Switchs et avec le domaine G. On retrouve également de nombreux motifs fonctionnels, tels que les domaines SH2, SH3, DH, PH, des domaines de liaisons à l'actine, à la calmoduline, des domaines PDZ impliqués dans la régulation de l'activité de ces GAPs. De la même manière que les RhoGEFs, certaines RhoGAPs sont spécifiques d'une RhoGTPase. C'est le cas de Myr5/Myr7 (pour RhoA) ou SrGAP1-3 (pour Cdc42). À l'inverse contrairement p90 ou PARG1 peuvent se lier à RhoA mais aussi à Rac et à Cdc42 (*Moon and Zheng 2003*).

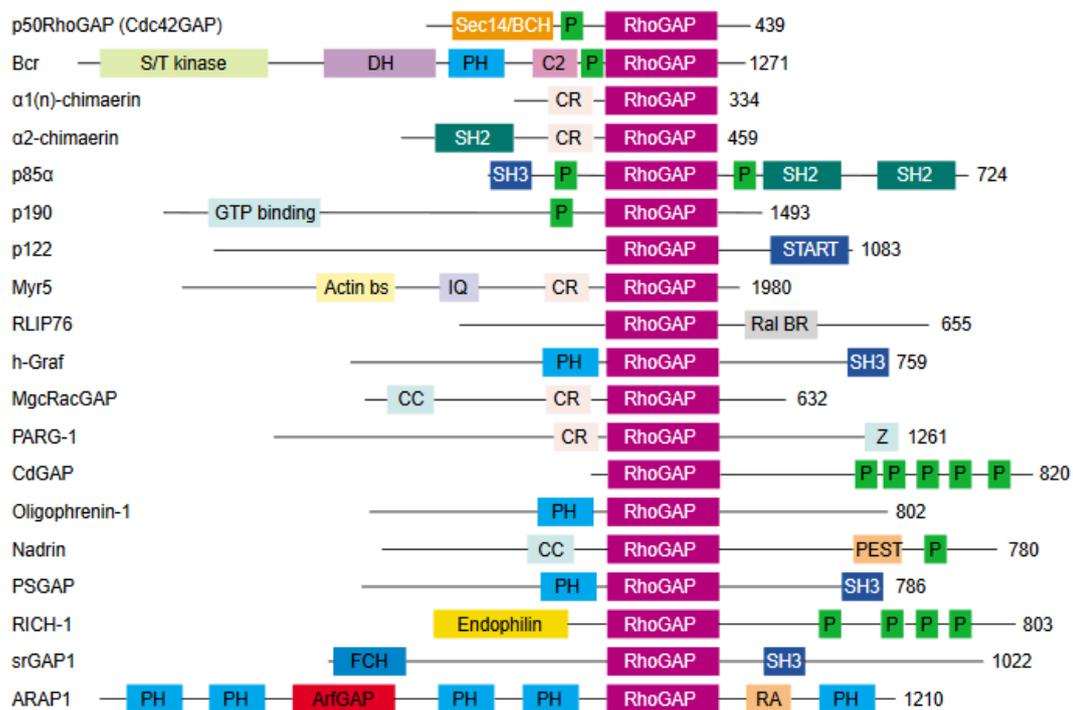


FIGURE 44 : Domaines fonctionnels caractéristiques des différents membres de la famille des RhoGAPs
(*Moon et Zheng, 2003*).

Abréviations: Actin bs, actin filament binding site; C2, calcium- dependent lipid binding; CC, coiled coil; CR, cysteine rich, zinc butterfly motif, binds diacylglycerol and phorbol ester; DH, Dbl homology; Endophilin, Endophilin homology domain; FCH, Fes/CIP4 homology domain; IQ, calmodulin binding; PH, pleckstrin homology; P, proline-rich SH3 binding motif; PEST, amino acids P-, E-, S- and T-rich degradation motif; RA, Ras-associating (also known as ralGDS/AF-6) domain; Ral BR, Ral GTPase binding region; Rho GAP, Rho GTPase-activating protein motif; Sec14/BCH, Sec14 homology/BNIP2 and Cdc42 GAP homology; SH2, Src homology 2; SH3, Src homology 3; S/T kinase, serine and threonine kinase; START; Star-related lipid transport domain; Z, PDZ binding region.

Diverses modifications post-traductionnelles sont couramment impliquées dans la régulation de l'activité des RhoGAP. C'est le cas pour la p190RhoGAP dont la phosphorylation par la protéine Src est nécessaire à son activation (Roof *et al.* 1998). Au contraire, la phosphorylation de RICS, une RhoGAP de Rac1 et Cdc42, par la kinase CAMKII (Ca²⁺/Calmodulindependant protein kinase II) aura un effet inhibiteur sur l'activité de la protéine (Okabe *et al.* 2003). La liaison des GAPs aux phospholipides peut également moduler la liaison au substrat. En 2004, Ligeti *et al.* ont montré que la liaison de la phosphatidylsérine à la p190RhoGAP pouvait inhiber son affinité pour RhoA et favoriser celle pour Rac1.

L'interaction des RhoGAPs avec d'autres protéines constitue un autre mécanisme de régulation de son activité. Nous pouvons donner l'exemple de la liaison de PRC1 (Protein Regulating Cytokinesis 1) au domaine GAP de MgcRacGAP qui permet la formation correcte du fuseau mitotique grâce à l'abolition de l'activité GAP envers Cdc42 pendant la métaphase (Ban *et al.* 2004).

Fait intéressant, certaines RhoGAPs possèdent des domaines DH-PH caractéristiques de RhoGEFs à domaines DH suggérant ainsi qu'elles catalyseraient probablement des réactions enzymatiques autre que la stimulation de l'hydrolyse du GTP des RhoGTPases. Certaines études proposent d'ailleurs que certaines RhoGAPs aient un rôle de suppresseur de tumeurs (Durkin *et al.* 2007).

➤ Les RhoGDIs

Les RhoGDIs vont inhiber la dissociation du GDP afin de séquestrer les RhoGTPases sous leur forme inactive. Elles sont au nombre de trois : RhoGDI-1(α), RhoGDI-2 (LyGDI ou D4GDI) et RhoGDI-3(γ) (Dovas *et Couchman* 2005).

- RhoGDI-1 est la plus abondante chez les mammifères. Elle est capable de former des complexes cytosoliques avec la plupart des membres de la famille des Rho (Ueda *et al.* 1990 ; Fukumoto *et al.* 1990).
- RhoGDI-2 semble être spécifique de Rac1. Elle est retrouvée principalement dans les cellules hématopoïétiques en particulier dans les lymphocytes B et T (Adra *et al.* 1993).
- RhoGDI-3 est exprimée préférentiellement dans le cerveau, le pancréas, le poumon, le rein et les testicules (Adra *et al.* 1997). *In vitro*, elle est capable d'interagir avec différentes RhoGTPases mais semble avoir une plus grande affinité pour RhoG et RhoB (Zalcman *et al.* 1996).

Au niveau structural, les RhoGDIs sont caractérisées par un domaine N-terminal flexible d'environ 70 acides aminés (résidus 1 à 69) qui se lie aux domaines Switchs et qui est responsable de l'inhibition de la dissociation du GDP (Dovas *et Couchman* 2005 ; Dransart *et al.* 2005).

L'organisation de RhoGDI-3 diffère néanmoins puisqu'elle possède en position N-terminale une extension impliquée dans sa localisation au niveau de l'appareil de Golgi (Dransart *et al.* 2005) (Figure 45A).

Le domaine C-terminal des RhoGDIs est très structuré. Il est organisé en deux feuilletts β qui vont créer une poche hydrophobe où viendra se loger le groupe isoprényle de la GTPase (Figure 45A et B) (Dovas *et Couchman* 2005). Les acides aminés qui tapissent cette poche sont hautement conservés chez les trois isoformes de

Les RhoGDIs sont des régulateurs essentiels puisqu'elles permettent le maintien d'un réservoir de RhoGTPases inactives, stables et disponibles. De ce fait, leur activité est extrêmement régulée. Bien que les mécanismes régulant la formation des complexes cytosoliques Rho-RhoGDI soient encore peu précis, la phosphorylation semble jouer un rôle majeur dans la stabilité du complexe. En effet, la phosphorylation de RhoA-GTP sur la sérine 188 par la PKA (Protéine Kinase A) entraîne sa libération des membranes lymphocytaires, probablement par une association accrue avec RhoGDI-1 (*Lang et Gesbert 1996*). De plus la phosphorylation de RhoA et Cdc42 respectivement sur la Ser188 (*Rolli-Derkinderen 2005*) et la Ser185 (*Dovas et Couchman 2005*), par la PKA augmente leur affinité pour la RhoGDI-1. La phosphorylation de Cdc42 sur la Tyr64 par la protéine Src semble améliorer son association avec la RhoGDI-1 (*Tu et al. 2003*).

En 2015, *Kuhlmann et al.* ont aussi montré que l'acétylation de la RhoGDI-1 pouvait affecter l'organisation du cytosquelette d'actine chez les mammifères. En effet, l'acétylation de la K178 semble diminuer la flexibilité de la poche hydrophobe. L'acétylation de la K52 qui est une modification de perte de fonction, affecte la structure de la protéine et supprime complètement l'activité de RhoGDI-1. Ainsi l'acétylation de la RhoGDI-1 semble affecter l'interaction avec la GTPase et contribuerait indirectement à affaiblir la liaison entre RhoA et l'actine F (*Kuhlmann et al. 2015*).

❖ Les effecteurs

Une fois activées et localisées dans le compartiment cellulaire adéquat, les RhoGTPases interagissent avec leurs effecteurs. Ce sont principalement les résidus localisés dans les domaines Switch I et II qui agissent comme site de reconnaissance aux effecteurs. Bien qu'il existe plus de 70 protéines effectrices, les sérines/thréonine kinases ROCK et la formine mDia, sont les plus décrites et les plus étudiées. Dans la suite de cette partie, nous détaillerons leurs structures et leurs mécanismes d'activation.

➤ **La formine mDia**

L'assemblage des monomères d'actine en structures filamenteuses ne se fait pas spontanément mais nécessite l'aide de facteurs qui peuvent être classés en trois groupes : le complexe Arp2/3 et ses facteurs de nucléation, les nucléateurs et les formines. Les membres de ces trois groupes utilisent des mécanismes différents pour accomplir la nucléation et l'élongation des filaments d'actine. Les formines, par exemple participent à la nucléation des molécules d'actine à partir de l'extrémité barbée.

Chez les mammifères, il existe 15 formines qui se regroupent en huit sous-familles différentes. Ce sont des protéines d'environ 140 kDa à domaines multiples. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine de liaison aux protéines Rho de type « armadillo repeat » appelé domaine GBD (G-proteins Binding Domain) et de deux domaines FH1 et FH2 (Formin Homology) qui participent à l'assemblage des filaments d'actine. Brièvement, le domaine FH1 interagit avec une protéine qui fixe les monomères d'actine liés au GTP, la profiline.

C'est la coopération entre la profiline et les formines *via* le domaine FH1 qui permet ainsi d'accélérer la réaction de polymérisation de l'actine (Romero *et al.* 2004).

Les formines possèdent également un domaine DAD (Diaphanous Auto-inhibitory Domain) en position C-terminale. À l'état basal, elles sont présentes dans une conformation auto-inhibée *via* l'interaction entre leurs domaines N- et C-terminaux (Figure 46). À noter, que l'auto-inhibition de nombreux effecteurs et plus particulièrement des formines est levée par leur interaction avec les RhoGTPases activées (Lammers *et al.* 2005).

Chez les mammifères, on retrouve trois isoformes de la protéine mDia : mDia1, mDia2 et mDia3 (Thumke *et al.* 2013). Elles sont impliquées dans la formation des filaments d'actine mais coopèrent également avec ROCK (Rho-Coil spiral Kinase) pour réguler la formation des fibres de stress. En plus de l'action dans la régulation du cytosquelette d'actine, Bartolini *et Gundersen* (2010) ont montré qu'elles jouaient un rôle dans la formation du réseau microtubulaire.

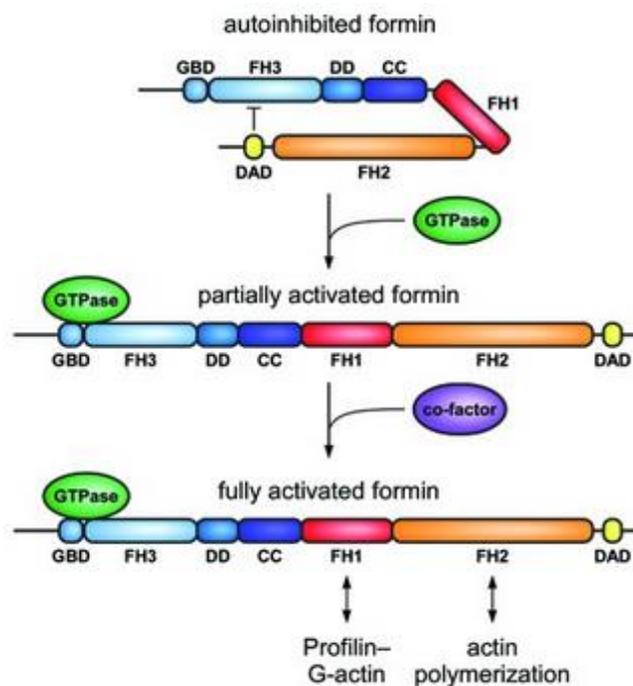


FIGURE 46 : Régulation de la formine mDia (Kühn and Geyer 2014).

Les formines sont constituées d'un domaine de liaison aux GTPases appelé domaine GBD, suivi d'un domaine adjacent FH3 ou DID (Diaphanous Inhibitory Domain) et d'un domaine C-terminal DAD (Diaphanous Autoregulatory Domain). À l'état basal, les protéines mDia sont dans une conformation repliées auto-inhibée par l'interaction des domaines DAD et FH3 (Alberts, 2001 ; Lammers *et al.* 2005 ; Li *et Higgs*, 2003). L'auto-inhibition de mDia est levée par l'interaction avec la GTPase RhoA active (Lammers *et al.* 2005 ; Li *et Higgs*, 2003). Les formines sont capables de lier l'actine G ou F via leur domaine FH2, et la profiline via leur domaine FH1.

La protéine mDia1 par exemple, se lie aux extrémités barbées des filaments d'actine et favorise l'activité de polymérisation (Figure 47). Son rôle est aussi essentiel à divers processus cellulaires incluant la mécano-transduction, la polarisation des cellules et la migration cellulaire. D'autres études ont également mis en évidence le rôle de mDia1 dans la transcription dépendante du SRF (Facteur de Réponse au Sérum) (Copeland *et*

Treisman 2002) ainsi que dans la phagocytose (*Brandt et al. 2007*). Le rôle antagoniste de ROCK et de mDia1 dans l'adhésion cellulaire des cellules épithéliales a également été rapporté (*Sahai et Marshall, 2002*).

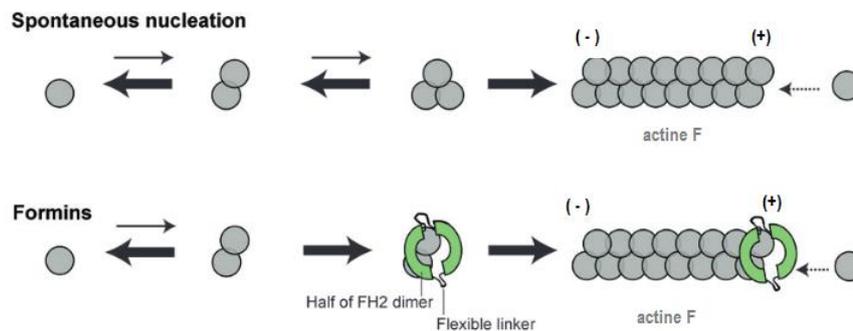


FIGURE 47 : Mécanisme par lequel la formine mDia1 participe à la nucléation des filaments d'actine (d'après Goode et Eck 2007).

L'assemblage spontané des filaments d'actine à partir de monomères d'actine purifiés est présenté à titre de comparaison.

Notons que les dimères et les trimères d'actine sont très instables et se dissocient rapidement.

La formine (en vert) stabilisent les dimères d'actine en interagissant avec l'extrémité barbée (+) du futur filament d'actine.

mDia2 joue plutôt un rôle dans la cytokinèse et dans la formation de filopodes. Il semblerait qu'elle soit aussi impliquée dans le trafic des endosomes chez les fibroblastes en culture (*Waller et al. 2007*).

Enfin, l'isoforme mDia3 semble être indispensable à l'alignement normal des chromosomes dans les cellules HeLa lors de la mitose (*Yasuda et al. 2004*). Bien que les autres fonctions de cette isoforme soient encore inconnues, *Gasman et al.* ont aussi mis en évidence en 2003 l'implication de mDia3 dans l'endocytose. Il a également été décrit qu'il existe 3 variants d'épissage de mDia3, appelés mDia3A, mDia3B et mDia3C. Toutefois, à l'exception de l'implication de mDia3C dans l'endocytose (*Koizumi et al. 2012*), le rôle des autres variants reste inconnu à ce jour.

➤ Les protéines ROCKs

Les sérines/thréonines ROCK (Rho-kinases) ont été les premières protéines effectrices de RhoA identifiées et caractérisées. Il existe deux isoformes de ROCK (ROCK 1 et 2) codés par deux gènes distincts (*Matsui et al. 1996, Nakagawa et al. 1996*). Les deux protéines ROCK partagent environ 64% d'homologie dont 83% dans le domaine kinase (*Amano et al. 2010*). Structurellement, elles sont proches des protéines DMPK (Myotonic Dystrophy Protein Kinase) et MRCK (Myotonic Dystrophy Kinase-related Cdc42-binding) et sont caractérisées par la présence d'un domaine kinase en N-terminal suivi d'un domaine superhélice. Celui-ci contient une région RBD (Rho-Binding Domain) suivi d'un domaine PH (Pleckstrin-Homology Domain) et CRD (Cysteine-Rich Domain) (*Figure 48*).

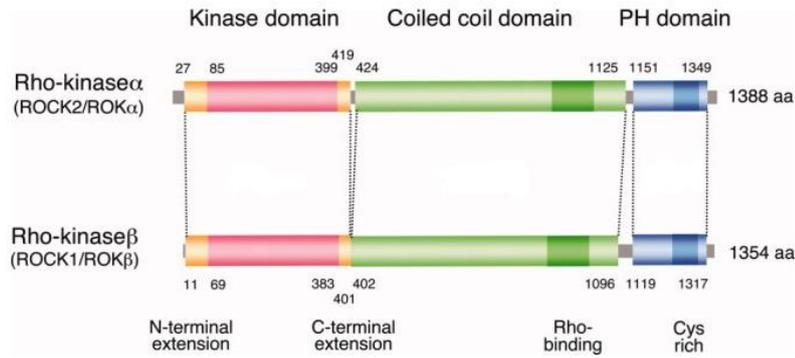


FIGURE 48 : Représentation schématique de la structure des protéines ROCK (Amano et al. 2010).

La partie N-terminale des protéines ROCK porte l'activité enzymatique. Le domaine PH se situe à l'extrémité C-terminale et le domaine de liaison aux RhoGTPases (Rho Binding Domaine ou RBD) se situe dans la région centrale coiled-coil.

Bien que ROCK1 et ROCK2 aient des domaines fonctionnels conservés, elles sont régulées à la fois par des mécanismes communs mais aussi spécifiques. Dans les cellules, les protéines ROCKs sont présentes dans une conformation repliée et inactive. En effet, la région C-terminale agit comme une région auto-inhibitrice *via* sa liaison au domaine kinase (Amano et al. 2010) (Figure 49). La délétion de cette portion entraîne d'ailleurs une activation constitutive de la kinase *in vitro* et *in vivo* (Amano et al. 2010). L'interaction des RhoGTPases actives avec le RBD des ROCKs va induire des changements conformationnels qui vont perturber l'interaction inhibitrice entre le domaine C-terminal et le domaine kinase de ROCK. Les protéines ROCKs peuvent également être activées indépendamment de leur liaison aux RhoGTPases. Dans un contexte apoptotique, ROCK1 est activée par clivage du domaine auto-inhibiteur par les caspases, tandis que ROCK2 peut être activé par clivage par le Granzyme B (Figure 49).

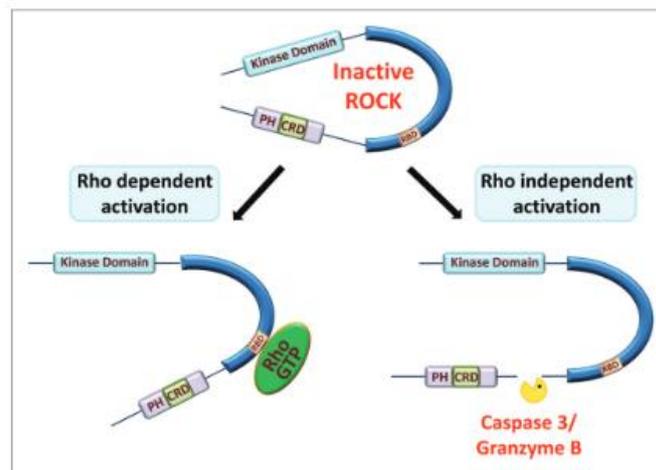


FIGURE 49 : Activation des protéines ROCKs (Julian et Olson 2014).

Dans sa conformation inactive, ROCK est auto-inhibé par l'interaction de son domaine kinase avec sa région C-terminale. L'interaction avec RhoA active lève cette auto-inhibition et permet l'ouverture et l'activation des ROCKs.

L'activation des protéines ROCK est également sous la dépendance d'autres kinases. La Polo Kinase de type 1 (PK1) par exemple agit en synergie avec RhoA en phosphorylant ROCK2 sur l'un des quatre résidus suivants : Thr967, Ser1099, Ser1133 ou Ser1374. De nombreuses protéines sont aussi capables de réguler négativement la signalisation passant par les protéines ROCKs comme Gem et Rad par exemple (*Ward et al. 2002*). De plus, contrairement aux protéines RhoA, B et C qui vont stimuler la formation de fibres de stress à travers ROCK1, RhoE peut diminuer la formation de ces fibres en se liant à la région N-terminale (*Riento et al. 2003*). Il est intéressant de noter que la protéine kinase PDK1 peut également se lier à ROCK1, ce qui va perturber la régulation négative de ROCK1 par RhoE (*Pinner et Sahai 2008*).

Chez les vertébrés, les protéines ROCKs sont exprimées dans la plupart des tissus. Cependant, des niveaux plus élevés de ROCK2 sont retrouvés dans le cerveau et les muscles, tandis que pour ROCK1, les organes concernés sont le foie, les poumons et les testicules (*Nakagawa et al. 1996*). De nombreuses études ont montrées des différences fonctionnelles entre ROCK1 et ROCK2. RhoE semble se lier préférentiellement à ROCK1, alors que MYPT1 ne se lie qu'à ROCK2 (*Komander et al. 2008 ; Wang et al. 2009*). Des expériences utilisant des siARN ont démontrées que ROCK1 aurait un rôle dans la formation des fibres de stress alors que ROCK2 serait impliquée dans la différenciation cellulaire et serait essentielle aux processus de phagocytose (*Yoneda et al. 2005 ; Wang et al. 2009*) via la phosphorylation des MLC (Myosin Light Chain). En 2003 puis en 2005, *Thumkeo et al.* ont également montrés que la délétion de l'allèle *ROCK2* ou *ROCK1* chez des souris homozygotes était létale pour l'embryon alors que les souris hétérozygotes sont fertiles et semblent normales.

➤ Les autres effecteurs de RhoA

Bien que les protéines mDia et ROCKs soient les effecteurs les mieux caractérisés des RhoGTPases RhoA, Cdc42 et Rac1, il existe néanmoins de multiples autres protéines effectrices. Nous nous focaliserons ici, plus particulièrement sur certains d'entre eux et notamment sur les effecteurs de la GTPase RhoA.

La protéine Citron a été identifiée pour la première fois en tant qu'effecteur de RhoA (*Madaule et al. 1995*). Il existe 2 isoformes de cette protéine : une forme longue qui possède un domaine kinase appelé Citron-K et une forme plus courte, Citron-N, sans domaine kinase (*Di Cunto et al. 1998*). La Citron-K est exprimée dans des cellules proliférantes et joue un rôle dans la constriction de l'anneau contractile lors de la cytokinèse (*Di Cunto et al. 2000; Madaule et al. 1998*), par son activité kinase sur la MLC (*Yamashiro 2003*). La Citron-N est impliquée dans l'organisation de l'appareil de Golgi et participe au maintien de l'intégrité des dendrites des neurones primaires par la régulation du cytosquelette d'actine en interagissant localement avec ROCK2 et la profiline (*Camera et al. 2003, 2008*). *Di Cunto et al. (2002)* ont montré que le KO de Citron-K chez les spermatogonies de souris, induisait une cytokinèse anormale et la présence de spermatogonies polyploïdes.

Chez les mammifères, on trouve 3 isoformes de la protéine kinase N ou PKN (également appelée PRK) : PKN1, PKN2 et PKN3 (*Mukai 2003*). Les PKN sont activées par sa liaison à RhoA mais aussi par certains acides gras

(*Di Cunto et al. 1998*) insaturés tels que l'acide arachidonique (*Mukai, 2003*). Elles sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires telles que :

- La migration cellulaire (*Lachmann et al. 2011*)
- L'adhésion cellulaire (*Calautti et al. 2002*)
- Le transport vésiculaire (*Torbett et al. 2003*)
- L'apoptose (*Takahashi et al. 1998*)
- Le transport du glucose (*Standaert et al. 1998*)
- Le cycle cellulaire (*Misaki 2001*).

PKN1, par exemple, participe à la migration et la division des cellules musculaires lisses (*Singh et al. 2012*), la survie des myocytes cardiaques (*Kajimoto et al. 2011*), l'organisation neurofilamentaire, le transport axonal dans les neurones (*Manser et al. 2008*) et l'adhésion des cellules kératinocytaires. PKN2 est impliquée dans la formation de la jonction apicale dans les cellules épithéliales bronchiques (*Wallace et al. 2011*) ainsi que dans l'entrée et la sortie du cycle cellulaire dans les cellules HeLa (*Schmidt et al. 2007*). PKN3 joue un rôle dans la régulation des jonctions adhérentes dans les cellules endothéliales (*Möpert et al. 2012*) et dans la croissance des cellules cancéreuses prostatiques malignes (*Leenders et al. 2004*). Cependant, les mécanismes moléculaires précis n'ont pas encore été identifiés et demande à être approfondis.

À ce jour, deux isoformes de la raphiline, raphilin-1 et raphilin-2 sont connus chez les mammifères. La raphiline-1 est fortement exprimée dans les testicules, les reins, dans le cerveau et l'estomac (*Nakamura et al. 1999*). Compte tenu de son expression tissu-spécifique, la fonction de raphilin-1 est difficile à caractériser et reste relativement inconnue. Raphilin-2 est ubiquitaire (*Peck et al. 2002*) et pourrait supprimer la formation des fibres de stress d'actine dépendante de RhoA dans les cellules HeLa. Par ailleurs, une autre étude a montré que raphilin-2 était localisée aux niveaux des endosomes tardifs *via* son interaction avec RhoB mais sa fonction dans ce compartiment cellulaire reste inconnue (*Steuve et al. 2006*).

La rhotékinine est une molécule effectrice de RhoA identifiée suite à un criblage en double chez la levure (*Reid et al. 1996*). Son RBD possède une forte affinité pour RhoA-GTP et il est largement utilisé pour les expériences de pull-down de RhoA active (*Ren et Schwartz 2000*). Il existe deux isoformes connues de la rhotékinine : rhotekin1 et rhotekin2. Contrairement à l'expression ubiquitaire de rhotekin1, l'expression de rhotekin2 se limite à une lignée particulière de lymphocytes (*Collier et al. 2004*). *In vivo*, il y a encore peu de données sur la fonction exacte des rhotékinines. Toutefois, *in vitro*, il semblerait que la rhotekin1 soit impliquée dans la régulation du cytosquelette des synapses neuronales (*Ito et al. 2006*), la différenciation des cellules souches neuronales et dans la résistance à l'apoptose dans une lignée de cellules cancéreuses gastriques. Rhotekin 2 jouerait plutôt un rôle dans la résistance à l'apoptose dans les lymphocytes (*Collier et al. 2004*).

3- Modifications post-traductionnelles

Les fonctions biologiques des RhoGTPases sont principalement dépendantes de leur localisation cellulaire. Les différentes MPT que nous allons décrire dans cette partie, participent à la régulation de la localisation des RhoGTPases mais aussi à la modulation de leur activité catalytique. La partie C-terminale des RhoGTPases et notamment la région poly-basique ainsi que le motif CAAX sont principalement concernées.

❖ La prénylation

La prénylation est une modification post-traductionnelle qui se caractérise par le greffage covalent d'un lipide isoprénoïde sur une cystéine en position C-terminale du motif CAAX. La première étape consiste en la formation d'une liaison thioester entre la fonction thiol de la cystéine et le lipide. La réaction catalysée par la FTase (Farnésyl Transférase) permettra la fixation d'un groupement farnésyl à 15 carbones tandis que la GGTase I (GéranylGéranyl Transférase) permettra la liaison d'un groupe géranylgéranyl à 20 carbones. La protéine subit ensuite une étape de protéolyse des 3 acides aminés (-AAX) par une endoprotéase (RCEI), puis de carboxyméthylation de la fonction acide carboxylique de la cystéine par la ICMT (Isoprenyl Cystéine carboxy MéthylTransférase) (Figure 50).

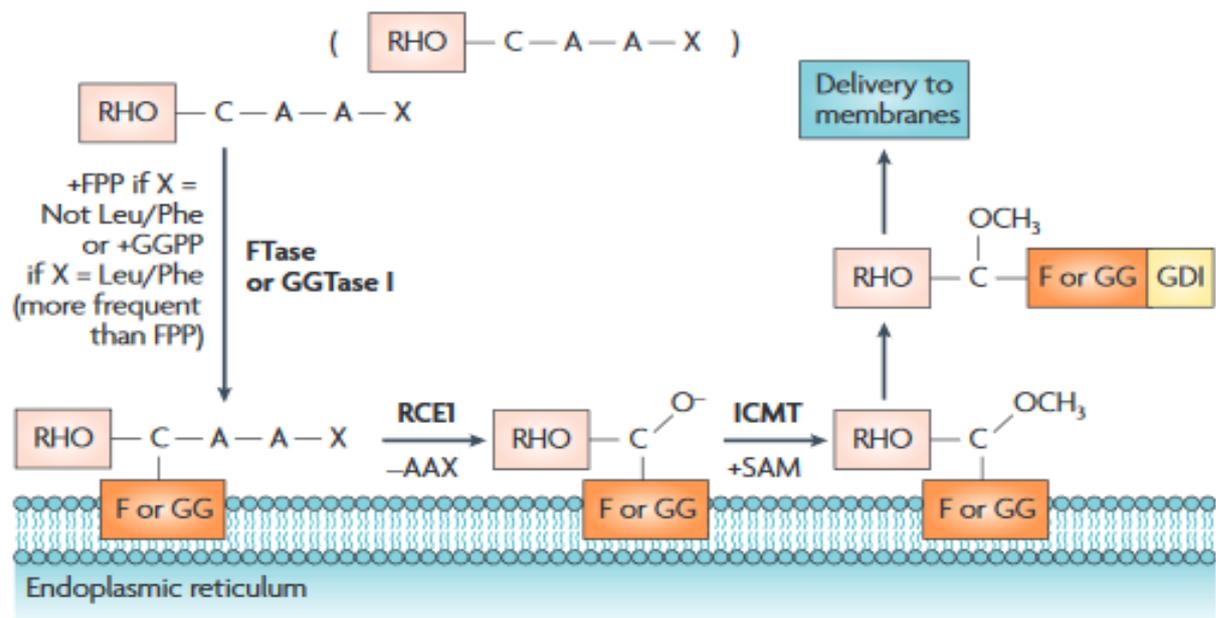


FIGURE 50 : Prénylation des RhoGTPases (Wang et Casey, 2016)

Les RhoGTPases sont prénylées ou géranylgéranylées. Elles subissent ensuite une étape de protéolyse qui permet l'élimination du tripeptide AAX par l'enzyme RCE1 et de carboxyméthylation par isoprenylcystéine carboxyméthyltransférase (ICMT).

La nature de l'isoprène greffé va dépendre de la nature de l'acide aminé X du motif CAAX. Ainsi, dans le cas où l'on trouve une sérine ou une méthionine, un groupe farnésyl sera transféré. S'il s'agit d'une leucine, une isoleucine ou une phénylalanine, la protéine sera géranylgeranylée. Exception pour RhoB qui bien qu'elle possède une leucine en position C-terminale sur le motif CAAX, pourra être soit farnésylée soit géranylgeranylée (*Figure 50*). La prénylation des RhoGTPases permet d'augmenter l'hydrophobicité des RhoGTPases. Elle est donc essentielle à leur localisation à la membrane et de ce fait à leurs interactions avec leurs effecteurs et régulateurs. Des études réalisées sur RhoB ont aussi montré que la localisation de la protéine était dépendante du type d'isoprène greffé (*Wherlock et al. 2004*). Ainsi, si RhoB est farnésylée, elle sera localisée préférentiellement au niveau de la membrane plasmique alors que si elle est géranylgeranylée elle se retrouvera plutôt au niveau des endosomes (*Milia et al. 2005*).

❖ [La phosphorylation](#)

Contrairement à la prénylation qui module sa localisation cellulaire, la phosphorylation des RhoGTPases impacte essentiellement son activité GTPasique. La phosphorylation de la sérine 188 de RhoA, par la PKA et la PKG favorise son interaction avec les RhoGDIs et donc son inactivation. Cette phosphorylation perturbe spécifiquement la liaison de RhoA à son effecteur ROCK, mais pas avec des effecteurs comme la Rhotekine, mDia ou PKN, soulignant le rôle de son extrémité carboxy-terminale dans les interactions avec les effecteurs (*Nusser et al. 2006*). Dans le cas de RhoB, la phosphorylation de la Ser185 par la kinase CK1 aboutit elle aussi à une inactivation de RhoB (*Tillement et al. 2008*). Cdc42 peut aussi être phosphorylée sur la Ser188 par la PKA, induisant de même le détachement de la protéine de la membrane et favorisant ainsi son association avec les RhoGDIs. Elle peut également être phosphorylée par la kinase Src sur la Tyr64 après stimulation de lignées cellulaires humaines par l'EGF (Epidermal Growth Factor). Cette modification va favoriser sa liaison aux GDIs, mais n'aura aucune conséquence sur sa capacité à lier ses différents effecteurs tels que WASP, PAK et IQGAP (*Tu et al. 2003*).

❖ [La palmitoylation](#)

Certaines protéines Rho peuvent également être palmitoylées par une palmitoyltransférase sur la cystéine en amont de la cystéine prénylée. RhoB, par exemple, est palmitoylé sur les cystéines 189 et 192 en amont de la cystéine 193 prénylée. La nécessité de cette modification a été mise en évidence pour les activités anti-tumorales et pro-apoptotiques de RhoB (*Wang et Sebt 2005*). De plus, en 2001, *Michaelson et al.* ont montré que l'inhibition de la palmitoylation par le 2-bromopalmitate pouvait induire la localisation incorrecte de RhoB sur l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique et une absence de sa localisation à la membrane plasmique. La palmitoylation est également un mécanisme de régulation pour d'autres GTPases Rho telles que RhoU et RhoV.

❖ L'ubiquitination

L'ubiquitination est aussi une modification post-traductionnelle que l'on peut retrouver chez les RhoGTPases. Bien que cela aboutit généralement à leur dégradation, l'ubiquitination peut aussi favoriser leur interaction à d'autres protéines. RhoA par exemple, peut être ubiquitinée sur les lysines 6 et 7 par l'E3 ubiquitine ligase Smurf1 induisant sa liaison à la PKC ζ , permettant ainsi le maintien de la polarité cellulaire (Wang *et al.* 2003). L'ubiquitination de Rac1 est parfois associée à sa phosphorylation par Akt (Zhao *et al.* 2013). Ce phénomène semble essentiel à sa dégradation. De plus, de nombreux travaux suggèrent aussi que l'ubiquitination des RhoGTPases module leur localisation. Toujours dans le cas de Rac1, il a été montré que son ubiquitination favorise sa localisation aux structures endosomales (Nethe *et al.* 2010).

❖ La transglutamination

Cette modification post-traductionnelle consiste en la formation de liaisons covalentes entre des groupes amines libres, par exemple ceux de résidus de lysine, et le groupe gamma-carboxamide des résidus de glutamine. La transglutamination active en permanence les protéines Rho en ciblant la glutamine de leurs domaines Switch II (Flatau *et al.* 1997). La protéine CNF1 (Cytotoxic Necrotizing Factors1) catalyse par exemple la désamidation de la Glu63 de RhoA et de la Glu61 de Rac1 et Cdc42 en un acide glutamique, conduisant ainsi à l'activation constitutive des RhoGTPases (Schmidt *et al.* 1997). L'activation de RhoA par la transglutaminase tissulaire (TGM2) conduirait également à une augmentation de l'activation de ROCK2 et favoriserait la formation de fibres de stress, d'adhésion focales et induirait la différenciation neuronales (Singh *et al.* 2001).

❖ L'AMPylation

L'AMPylation des protéines est une modification stable et réversible qui consiste en la liaison covalente d'une molécule d'adénosine monophosphate (AMP) sur une sérine, thréonine ou tyrosine. Les enzymes capables de catalyser cette réaction sont appelées « AMPylators ». Des études récentes ont montré que les bactéries utilisent des facteurs de virulence pour inactiver les RhoGTPases en modifiant la conformation du domaine Switch1 par l'ajout de modifications post-traductionnelles. L'AMPylation des RhoGTPases par la protéine VopS au cours de l'infection à *Vibrio parahaemolyticus* induit une désorganisation massive du cytosquelette d'actine. D'autres fonctions de signalisation médiées par les RhoGTPases sont aussi impactées comme l'inactivation des voies NF κ B, Erk et JNK, ou encore l'absence de dégradation des RhoGTPases. Ces mécanismes sont probablement applicables à de nombreux autres modèles d'infection bactérienne.

B. Fonctions biologiques

Les RhoGTPases sont des acteurs clés dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine mais elles sont également essentielles à de nombreux processus cellulaires, tels que la régulation de la transcription des gènes, la prolifération cellulaire ainsi que l'équilibre survie/apoptose. De par leurs rôles dans la modulation de la dynamique du cytosquelette d'actine et du réseau microtubulaire, elles contrôlent également la motilité, la morphologie, la polarité cellulaire, l'adhésion intercellulaire ainsi que le trafic vésiculaire endo- et exocytair.

1- Les Rho GTPases dans la régulation de l'organisation du cytosquelette et fonctions associées

❖ Cytosquelette d'actine

Les voies de signalisation par lesquelles les RhoGTPases exercent une régulation sur le cytosquelette d'actine sont très complexes. La GTPase RhoA intervient principalement dans la formation des fibres de stress et des plaques d'adhérence tandis que Cdc42 et Rac1 sont impliquées respectivement dans la formation des filopodes et des lamellipodes (*Figure 52*). Nous décrivons ici les voies de signalisation impliquant les RhoGTPases humaines de la sous-famille Rho, Rac et Cdc42 qui participent à la régulation de la dynamique de l'actine nécessaire aux processus cellulaires tels que la migration ou encore l'adhésion cellulaire.

La formation de fibres de stress et les adhérences focales sont médiées par la voie de signalisation Rho/ROCK (*Amano 2010*).

ROCK1 phosphoryle la MLC menant à la contractilité des fibres d'acto-myosine. En même temps, ROCK bloque la déphosphorylation de la MLC en inhibant la MLC phosphatase *via* la sous-unité de liaison de la myosine (MBS). Cependant, la formation de fibres de stress normales nécessite également la présence de la formine mDia.

Les LIM kinases sont également des effecteurs de RhoA mais aussi de Cdc42. Elles sont phosphorylées par ROCK1 respectivement sur les Thr508 et Thr505 (*Pandey et al. 2006*), ce qui induit une augmentation de la phosphorylation de la cofiline (facteur de dépolymérisation de l'actine) sur la Ser3 (*Moriyama et al. 1996*).

En résumé, ROCK1 active, induit le maintien des fibres de stress en augmentant la contractilité des filaments d'acto-myosine *via* la phosphorylation de la MLC et en stabilisant les filaments d'actine par l'intermédiaire de l'activation des LIMKs entraînant la phosphorylation et donc l'inhibition de la cofiline (*Figure 51*).

La signalisation en aval de Cdc42 et de Rac1 implique d'autres effecteurs tels que la protéine activatrice PAK (p21 sérine/thréonine kinase) (*Figure 52*). Les isoformes de PAK ont un domaine de régulation N-terminal et un domaine catalytique C-terminal. Elles partagent un domaine commun responsable de l'interaction avec Rac et Cdc42, appelé domaine CRIB (Cdc42- and Rac-Interactive Binding). La liaison de la GTPase active va perturber

la conformation auto-inhibitrice de la PAK et activer son domaine catalytique. La PAK active pourra alors phosphoryler la MLCK, l'inactivant ainsi et inhibant la phosphorylation et la contractilité de la MLC (*Sells et al. 1999*).

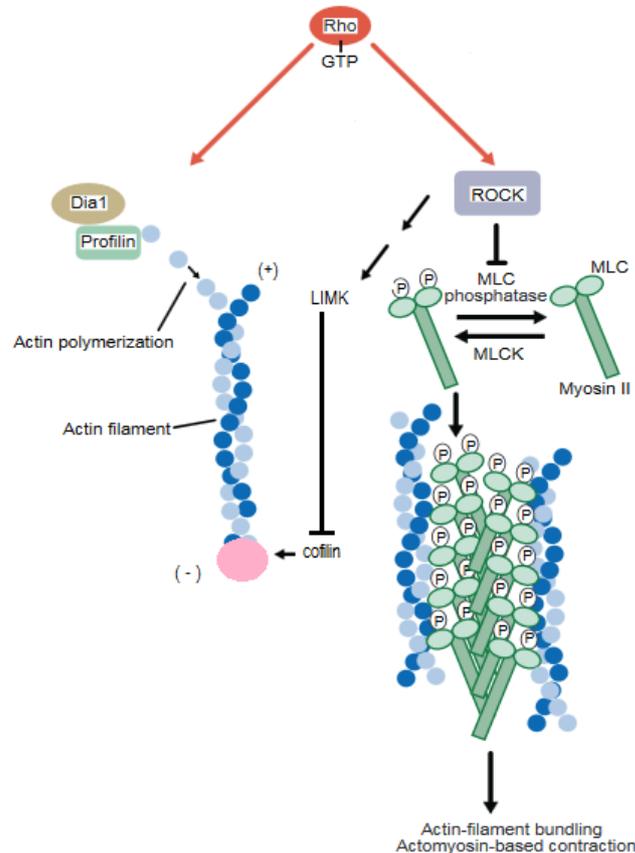


FIGURE 51 : Modèle de coopération entre ROCK et mDia dans la formation des fibres de stress induite par l'activation de RhoA (*Ridley 1999*).

RhoA-GTP, par l'activation de ROCK-1 va induire l'inhibition de la MLCP et donc l'accumulation de MLC phosphorylée générée par la MLCK. La myosine II phosphorylée pourra alors s'associer avec l'actine pour former des filaments d'acto-myosine constituant les fibres de stress. En parallèle, le complexe mDia-profiline participe à la polymérisation du filament d'actine. ROCK-1 participe indirectement au processus de polymérisation des filaments d'actine, en activant la LIMK, qui par phosphorylation va inhiber la cofiline.

Les RhoGTPases ont toujours été définies comme des actrices de la régulation de la dynamique de l'actine mais avec un rôle unique et bien défini. Cependant, il a été montré que RhoA n'est pas seulement limitée à la génération de la force contractile à l'extrémité arrière de la cellule. Par ailleurs, elle coordonne avec Rac1 et Cdc42 au bord de la cellule, la régulation du cytosquelette d'actine (*MacHacek et al. 2009*). D'autres travaux ont révélé une relation particulière entre RhoA et Rac1, où l'activation de Rac1 conduit à l'inactivation de RhoA et vice versa (*Sander et al. 1999 ; Zondag et al. 2000 ; Nimnua et al. 2003*). Cet antagonisme semble expliquer leurs rôles dans les voies de signalisation qui régulent l'adhésion cellulaire. RhoA et RhoC auraient également des rôles multiples dans les mécanismes de migration.

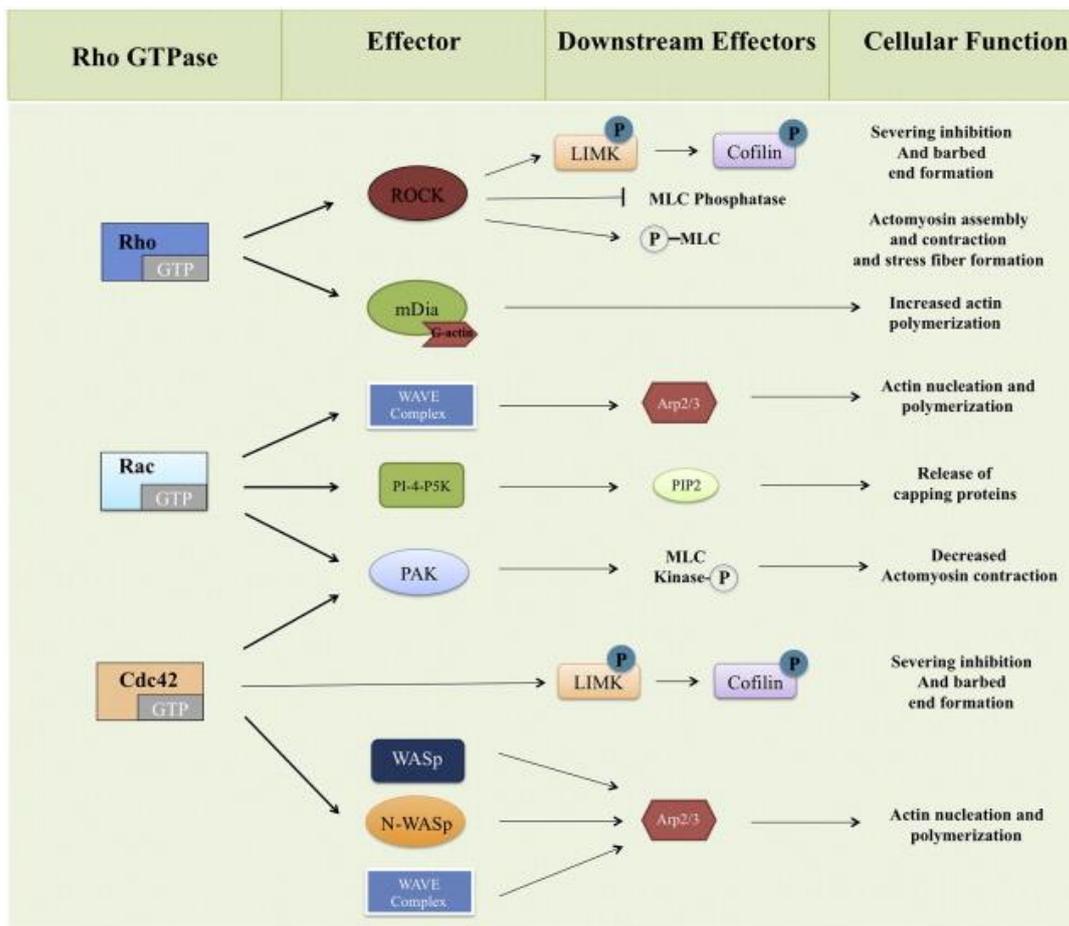


FIGURE 52 : Les RhoGTPases et leurs effecteurs (Hanna et El-Sibai 2013).

La sérine/thréonine kinase ROCK est principalement impliquée dans la formation des fibres de stress et des adhérences focales. ROCK phosphoryle la MLC menant à la contraction de filaments d'acto-myosine. Dans un même temps, ROCK bloque la déphosphorylation de la MLC en inhibant les MLCP. La formine mDia est un autre agent de nucléation de l'actine dépendant de RhoA. La LIMK est aussi un effecteur de RhoA, qui phosphoryle la cofiline inhibant ainsi son activité et donc la production d'extrémités barbées des filaments d'actine. La signalisation en aval de Cdc42 et Rac comprend les protéines appartenant à la famille WASP / SCAR / WAVE, qui sont des régulateurs clés de la nucléation et de la polymérisation de l'actine. La kinase PAK est une protéine effectrice commune de Rac et de Cdc42. Une fois activée, elle phosphoryle la MLCK, l'inactivant ainsi, ce qui empêche la phosphorylation et la contractilité du MLC. Le PAK phosphoryle également et active la LIMK, ce qui conduit à la phosphorylation de la cofiline inhibant sa fonction de coupure de l'actine.

❖ Réseaux microtubulaires

En aval de RhoA, la formine mDia régule la formation des microtubules (Palazzo et al. 2001 ; Ishizaki et al. 2001). En effet, elle est capable d'interagir avec les protéines APC (Adenomatous Polyposis Coli)/EB1 (End Binding protein 1), qui est un complexe protéique impliqué dans l'élongation et la stabilité des microtubules (Wen et al. 2004 ; Yamana et al. 2006). Les protéines Rac1 et Cdc42 jouent également un rôle dans la dynamique des microtubules en permettant leur élongation et leur stabilité. En effet, la protéine PAK activée par Rac1 et Cdc42

va phosphoryler et inhiber les protéines Op18/stathmines qui associées à l'extrémité positive des microtubules, induira ainsi leur désassemblage (*Gigant et al. 2003*).

Elles sont également capables d'activer IQGAP, qui en complexe avec CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein 170), une protéine associée à l'extrémité positive des microtubules, va permettre leur élongation (*Fukata, 2002 ; Gundersen, 2004*). Enfin, Cdc42 en participant à l'activation du complexe protéique mPAR6/protéine kinase C atypique ζ (PKC ζ) (*Sandrine et al. 2001*) va inhiber GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) par phosphorylation, ce qui permettra l'activation du complexe APC/EB1 et donc l'élongation des microtubules (*Etienne-Manneville et Hall 2003*).

❖ Trafic vésiculaire

Les Rho GTPases participent à la régulation du trafic vésiculaire (*Figure 53*). En 1996, *Lamaze et al.* ont été les premiers à mettre en évidence l'implication de RhoA et de Rac dans l'endocytose clathrine-dépendante. Dans les cellules Hela par exemple, RhoA est capable d'inhiber le processus d'internalisation des récepteurs à la transferrine (*Lamaze et al. 1996*) et bloque également le trafic vésiculaire des récepteurs muscariniques vers la membrane plasmique dans les cellules HEK293 (*Vögler et al. 1999*). Au contraire, dans d'autres lignées cellulaires, RhoA semble promouvoir l'endocytose des récepteurs à l'IL-2. L'activation de RhoA dans ce contexte est sous la dépendance de nombreux régulateurs tels que la PI3K, la PAK), le GCF2 (GC-binding Factor 2) ainsi que la protéine GRAF1 (GTPase Regulator Associated with Focal adhesion kinase-1). Il a d'ailleurs été démontré que l'utilisation d'inhibiteur de la PI3K et de la FAK pouvait supprimer l'endocytose de 30 à 70% en inhibant l'activation de RhoA (*Khandelwal et al. 2010*). De plus, l'augmentation de l'expression de GCF2, qui abolit l'expression de RhoA induirait une désorganisation du cytosquelette d'actine (*Shen et al. 2012*).

Rac1 est quant à elle, modulée par la PI3K mais aussi par le synaptojanine 2. En effet, cette dernière par son interaction directe et spécifique avec Rac1, va bloquer la formation des puits d'endocytose et donc inhiber ce mécanisme. Récemment, la protéine P-Rex1 (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1 protein) a été identifiée comme un régulateur impliqué dans le trafic du transporteur de glucose GLUT4 dans les adipocytes (*Balamatsias et al. 2011*). Cette GEF va être activée par la PIP3K et par les sous-unités β et γ des petites protéines G hétérodimériques qui agissent en synergie, pour permettre l'activation de Rac1 et faciliter le transport de GLUT4 vers la membrane. Rac1-GTP est capable d'inhiber l'endocytose de l'E-cadherine via son interaction avec la protéine IQGAP1 (IQ motif containing GAP homolog) (*Kuroda et al. 1996*).

L'implication de Cdc42 dans les mécanismes d'endocytose ainsi que dans le transport antérograde (ER-à-Golgi) et rétrograde (Golgi-à-ER) a également été établi (*Chi et al. 2013*) (*Figure 53*). Au cours de l'endocytose, Cdc42 interagit avec son effecteur, la protéine N-WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) qui va ensuite lier et activer le complexe protéique Arp2/3 fixé à l'actine, induisant ainsi à la polymérisation de celle-ci (*Cory et al. 2003*). L'endocytose clathrine dépendante implique aussi un autre effecteur de Cdc42, Toca-1 (transducer of Cdc42-

dependent actin assembly 1). Toca-1 possède trois domaines fonctionnels, un domaine F-BAR, un site de liaison à Cdc42 et un domaine SH3 (Src homology 3). Des expériences de FRET ont montré que Toca-1, Cdc42 et N-WASP formait un complexe trimérique retrouvé au niveau des vésicules d'endocytose (*Bu et al. 2010*).

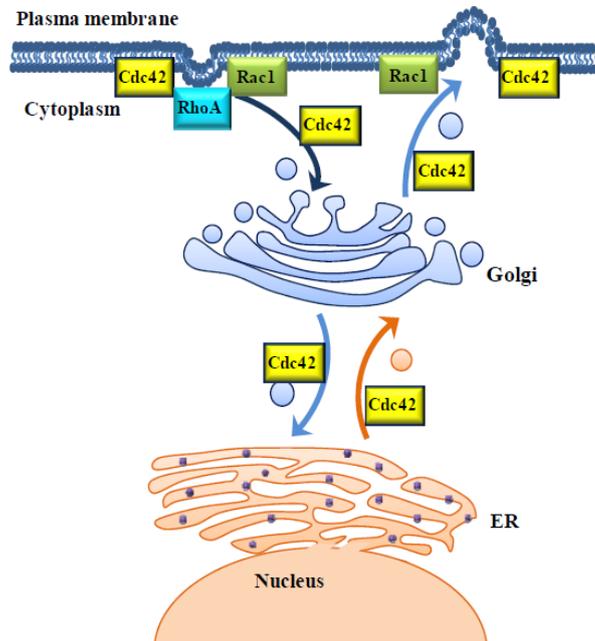


FIGURE 53 : Rôles des RhoGTPases dans le trafic vésiculaire (*Chi et al. 2013*).

Les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans les mécanismes d'endocytose clathrine-dépendant. Cdc42 joue également un rôle dans le transport vésiculaire rétrograde et antérograde.

2- Le rôle des RhoGTPases dans la transcription et le cycle cellulaire.

En plus de leur rôle dans l'organisation du cytosquelette, les RhoGTPases sont impliquées dans diverses voies de signalisation qui participent à la régulation de la transcription.

Nous pouvons donner l'exemple de l'élément de réponse au sérum (SRE) qui est sous la dépendance de deux facteurs de transcription : le facteur complexe ternaire (TCF) régulé par la voie Ras / MAP kinase et le facteur de réponse au sérum (SRF) régulé par la RhoGTPase RhoA. En outre, le SRF nécessite un co-activateur, MAL (ou MLK1), qui se déplace du cytoplasme vers le noyau en réponse à l'activation de RhoA (*Settleman 2003*).

Rac1 et Cdc42 ainsi que RhoA affectent également la transcription des gènes par des voies de transduction du signal n'impliquant pas le cytosquelette d'actine. Les trois GTPases sont capables d'activer la voie JNK (Jun N-terminal Kinase, c-Jun amino-terminal kinase) et celle des MAP kinases (*Teramoto et al. 1996 ; Eblen et al. 2002*). Il existe d'ailleurs au moins quatre MAP kinase kinase kinases (MAPKKK) qui sont des cibles directes des protéines Rho: MLK2, MLK3 et MEKK4 interagissent avec Rac1/Cdc42, alors que MEKK1 interagit avec RhoA et avec Rac1/Cdc42, sur des sites différents (*Gallagher et al. 2004*).

Les RhoGTPases sont également impliquées dans le cycle cellulaire et cela à différentes étapes de ce

processus. Les exemples concernant leurs implications sont nombreux, c'est pourquoi, nous ne décrivons ici que quelques cas concernant les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42.

De nombreux travaux ont démontré que l'inhibition de RhoA, Rac1 ou Cdc42 pouvait bloquer la progression du cycle cellulaire en phase G1 dans une variété de types de cellules de mammifères, mais les mécanismes étant dépendants de type cellulaires, se sont révélés difficiles à élucider (*Olson et al. 1995*).

Pourtant, en 2004 l'implication de Cdc42 dans la mitose a été mise en évidence par *Yasuda et al.* En effet, ces auteurs ont montré dans des cellules HeLa, qu'un traitement à la toxine B de *Clostridium difficile* empêchait l'alignement des chromosomes en métaphase. Ils ont également observé que les cellules HeLa exprimant un mutant dominant négatif N17-Cdc42 présentaient le même phénotype que les cellules traitées à la toxine B alors que les mutants N19-RhoA et N17-Rac1 n'induisent aucun phénotype (*Narumiya et Yasuda 2006*). De plus, mDia3 semble interagir avec Cdc42-GTP mais aussi avec la protéine CENP-A *in vitro* et se co-localise avec celles-ci *in vivo* (*Narumiya et Yasuda 2006*). Enfin, l'interférence de mDia3 par ARNi conduit de nouveau à un arrêt de la mitose semblable à celui induit par la toxine B. Les auteurs proposent donc que Cdc42 et son effecteur mDia3 jouent un rôle dans la régulation de l'attachement des microtubules aux kinétochores (*Yasuda et al. 2004*).

L'interaction des microtubules astraux avec le cortex cellulaire pourrait aussi être sous la dépendance des RhoGTPases. *Bakal et al. (2005)* ont montré que la RhoGEF Lfc était nécessaire à la formation du fuseau mitotique pendant la prophase et la prométaphase. En effet, l'inhibition de Lfc ou l'expression d'un mutant Lfc catalytiquement inactif entraîne un retard dans la mitose et une accumulation de cellules en prométaphase due à leur incapacité à assembler un fuseau mitotique fonctionnel. L'inhibition de RhoA par la transférase C3 de *Clostridium botulinum* semble également empêcher l'assemblage normal du fuseau et entraîner un retard dans la progression mitotique (*Thumkeo et al. 2013*). Enfin, en 2005 *Bakal et al.* ont montré que l'expression du mutant RhoA G14V/F39A était capable d'interagir spécifiquement et uniquement avec mDia1, restaurant les défauts de formation du fuseau mitotique. Ces résultats démontrent donc le rôle de la voie Lfc-RhoA-mDia1 dans la mitose (*Bakal et al. 2005*).

Au cours de la cytokinèse, l'assemblage de l'anneau contractile d'actine est sous le contrôle du fuseau central qui nécessite la formation des filaments d'acto-myosine *via* l'activation de RhoA (*Figure 54*). RhoA est donc un acteur essentiel dans la régulation de l'assemblage de cet anneau. Dans ce contexte, l'activation de RhoA est aussi sous la dépendance de la GEF Ect2 et de la GAP MgcRacGAP. Ect2 est régulée spatiotemporellement par le « centralspindlin complex ». Ce complexe présent chez tous les métazoaires, est constitué d'un homodimère de MKLP-1 qui se lie à MgcRacGAP, lui aussi homodimérique. L'oligomérisation de ce complexe est régulée par les protéines 14-3-3 et la kinase Aurora B. En outre, la phosphorylation de MKLP1 par Aurora B va empêcher sa liaison aux protéines inhibitrices 14-3-3 permettant ainsi la formation d'un complexe actif qui pourra se localiser au niveau du fuseau central et de la membrane plasmique. Une fois activé, le « centralspindlin complex » va pouvoir se lier Ect2 pour l'activer permettant ainsi d'activer RhoA et l'assemblage des filaments d'actine *via* mDia, ROCK et l'anilline (*Basant et Glotzer 2018*) (*Figure 54*).

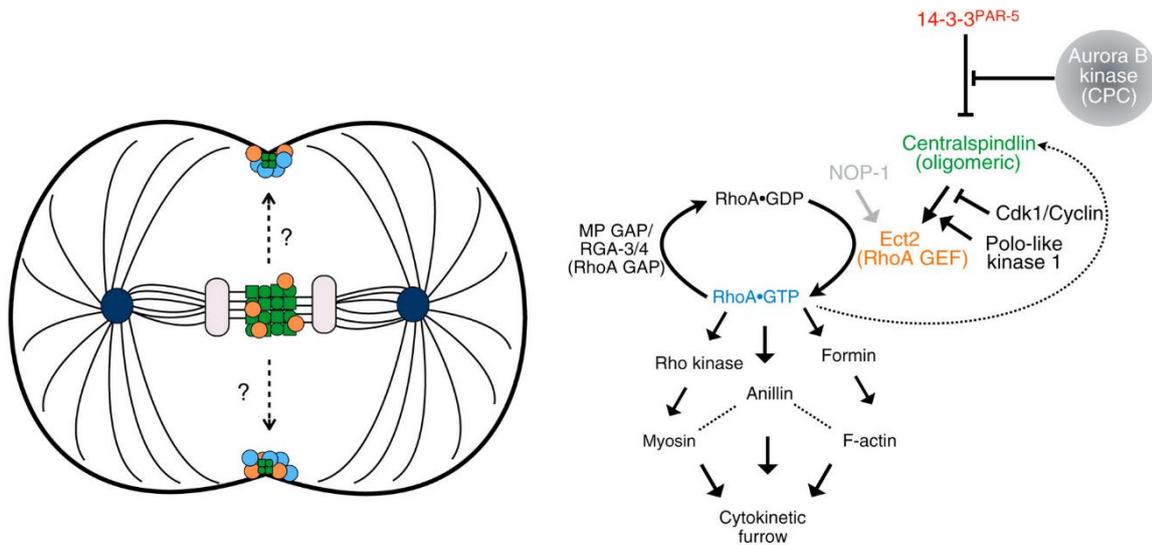


FIGURE 54 : Rôle de la RhoGTPase RhoA dans l'assemblage de l'anneau contractile, au cours de la cytokinèse (d'après Basant et Glotzer 2018).

La GTPase RhoA, liée au GTP, active l'assemblage de l'actine via la formine, ROCK et l'anilline. La GEF Ect2 est régulée spatiotemporellement par le « centralspindlin complex ». La polo kinase 1 phosphoryle Cyk4, ce qui permet son interaction avec Ect2, une fois que l'activité de Cdk1 diminue lors de l'anaphase. Les protéines 14-3-3 se lient à MKLP1, empêchant ainsi l'oligomérisation du « centralspindlin complex ». La phosphorylation de MKLP1 par Aurora B bloque la liaison des protéines 14-3-3, activant ainsi une forme oligomérique fonctionnelle du complexe qui pourra alors se localiser au niveau du fuseau central et de la membrane plasmique.

3- Les RhoGTPases et l'apoptose.

Le rôle précis des RhoGTPases dans les mécanismes d'apoptose n'a pas encore été clairement établi. En effet, il semblerait qu'elles aient un rôle pro-apoptotique alors que d'autres études suggèrent une fonction anti-apoptotique. Il s'avère pourtant que les différents résultats obtenus soient dépendants du contexte cellulaire.

Dans les fibroblastes NIH-3T3 et les lignées érythrocytaires K562, la surexpression de RhoA et Rac1 induit l'apoptose en réponse à une augmentation du taux de céramides, de seconds messagers inducteurs de l'apoptose et de l'activation de la voie caspase (Esteve *et al.* 1995 ; 1998).

D'autres observations semblent confirmer le rôle pro-apoptotique des RhoGTPases. En effet, il a été montré que l'expression d'un mutant dominant négatif de Rac1, chez les cellules U937, pouvait inhiber le processus d'apoptose induite par un traitement au TNF α (Esteve *et al.* 1998).

Les RhoGTPases sont capables d'activer divers facteurs de transcription, comme STAT3, AP-1 et NF- κ B, qui jouent un rôle dans la régulation de l'expression de gènes anti-apoptotiques. En 2004, Liu *et al.* ont montré que la rhotectine, effecteur de RhoA pouvait activer la voie NF- κ B, induisant ainsi une protection des cellules de l'apoptose chimio-induite. Par ailleurs, Rac1 protégerait également les cellules tumorales de l'apoptose induite

via la génération de radicaux libres oxygénés (*Pervaiz et al. 2001*). Des travaux réalisés sur différentes lignées cellulaires (HEK, Swiss-3T3, M14, ect) auraient d'ailleurs montrés que la capacité de Rac1 à supprimer l'apoptose serait liée à l'activation de NF-kB (*Joneson et Bar-Sagi 1999*).

Enfin, il a été démontré que Rac1 en activant PAK (p21-activated kinase) pourrait favoriser la survie des neurones (*Johnson et D'Mello 2005*). PAK, qui est connue pour favoriser la survie cellulaire par l'activation des voies MAPK, semble inhiber l'expression des protéines pro-apoptotiques (par exemple, Bad) et activer l'expression des membres anti-apoptotiques (par exemple, Bcl-xL) de la famille des protéines Bcl-2 (*Loucks et al. 2006*).

C. Les RhoGTPases du schistosome

Actuellement, nous possédons peu de connaissances sur les voies de signalisation impliquant les RhoGTPases chez les schistosomes. Pourtant plusieurs travaux ont permis d'identifier plusieurs gènes codant pour des protéines de liaison au GTP de faible poids moléculaire (low-molecular weight GTP-binding proteins = LMWGs) chez le parasite. En 2002, *Santos et al.* caractérisent un nouveau gène de *S. mansoni* (SmRho1) codant pour une protéine de 193 acides aminés et d'environ 21,8 kDa. Dans le but d'identifier le rôle de celle-ci, des expériences de complémentation effectuées chez la levure ont été réalisées. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, RHO1 est une protéine régulatrice impliquée dans contrôle du cycle cellulaire et qui intervient également dans la croissance des bourgeons en contrôlant la polarisation cellulaire. La protéine SmRho1 semble capable d'effectuer toutes ces fonctions biologiques de la même manière que la protéine de levure. Cependant, les auteurs ont observé diverses altérations phénotypiques telles que l'arrêt du cycle cellulaire et un changement dans la morphologie des cellules (cellules plus grandes), provoquées par la surexpression du gène *Smrho1* chez une souche de levure KO. Ces résultats suggèrent que la GTPase SmRho1 n'est pas capable d'effectuer ces fonctions biologiques correctement, ce qui s'expliquent probablement par des interactions défectueuses entre SmRho1 et les protéines régulatrices et effectrices de la GTPase de levure, en raison sans doute, des différences dans les séquences d'acides aminées existantes entre la GTPase hétérologue et native.

Une étude plus approfondie a montré que SmRho1 possédait entre 71 et 75% d'identité et 85% de similarité avec les protéines humaines Rho A, B et C (*Figure 55*) (*Vermeire et al. 2003*). Elle semble également géranylgénanylée mais pas farnésylée. De plus, l'étude de l'expression de la protéine chez le parasite a montré qu'elle était exprimée dans les cinq stades parasitaires et préférentiellement localisée au niveau des organes reproducteurs du parasite.

INTRODUCTION

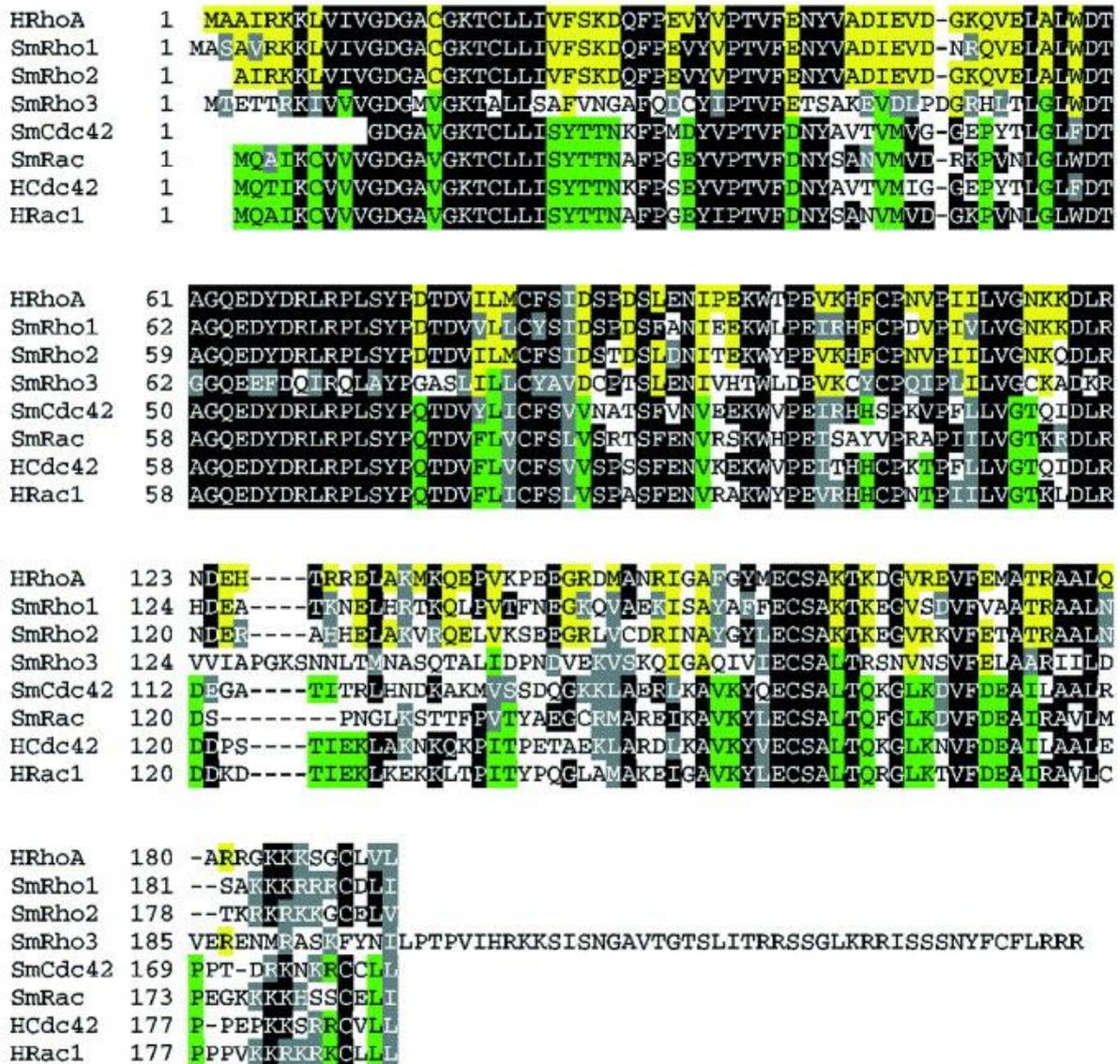


FIGURE 55 : Alignement multiples des RhoGTPases humaines et de *S. mansoni* (Vermeire et al. 2003).

HsRhoA (NP_001655), HsCdc42 (NP_001782), HRac1 (NP_008839). En jaunes, les résidus conservés chez les RhoGTPases de la sous-famille Rho, et en vert ceux de la sous-famille Cdc42 et Rac.

Concernant les autres RhoGTPases de *S. mansoni*, il semblerait que le parasite possède également des gènes codant pour des protéines orthologues à Cdc42, Rac et Rho. Une RhoGTPase spécifique de *S. mansoni* a également été identifiée, SmRho3. Elle possède en C-terminal une extension de 46 acides aminés non observées chez les autres RhoGTPases de la sous-famille Rho et donc aucun motif de prénylation suggérant un rôle biologique spécifique du parasite.

Bien que différentes études aient permis de caractériser les RhoGTPases et notamment la protéine Rho1 de *S. mansoni*, son rôle n'a pas encore été déterminé précisément. Toutefois, Quack et al., en 2009 propose que SmRho1 ait une fonction dans la modulation du cytosquelette d'actine dans les organes reproducteurs du

parasite. Ils montrent que la GTPase est capable d'interagir avec une formine parasitaire SmDia, également partenaire du récepteur SmTK3. Des expériences d'hybridation *in situ* démontrent aussi que les transcrits de SmDia, SmRho1 et SmTK3 co-localisent dans les gonades des parasites mâles et femelles. Ils proposent donc que ces données mettent en évidence l'existence de deux voies de signalisation distinctes qui impliquent SmRho1, SmTK3 et SmDia, coopérant probablement pour organiser le cytosquelette dans les organes reproducteurs du schistosome (Figure 56). Une autre information importante qu'il est nécessaire de souligner concernent les modifications post-traductionnelles des RhoGTPases parasitaires. En effet, Hong *et al.* (2016) en réalisant l'acétylome global de *S. japonicum* ont montré que la protéine Rho1 de *S. japonicum* (SjRho1) était acétylée sur la lysine 141.

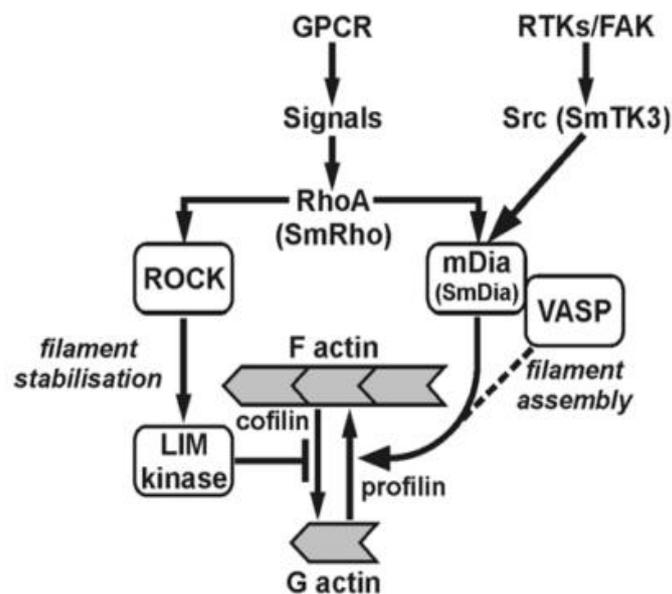


FIGURE 56 : Modèle de voies de signalisation impliquant les protéines SmRho1, SmTK3 et la formine SmDia (Quack *et al.* 2009).

Chez *S. mansoni*, Quack *et al.* proposent un modèle de signalisation qui implique deux voies de transduction du signal coopératif qui jouerait un rôle dans l'organisation du cytosquelette, dans les organes reproducteurs du parasite.

OBJECTIF

OBJECTIFS

La schistosomiase est la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme. Elle fait partie des principales maladies tropicales négligées, recensées par l'OMS. *Schistosoma mansoni* est un parasite infestant l'Homme, responsable de la schistosomiase intestinale. Il possède un cycle de vie complexe, comportant 5 stades de développement morphologiquement différents et deux hôtes successifs, un hôte intermédiaire, le mollusque *Biomphalaria glabrata* et un hôte définitif, l'Homme. Il existe actuellement un unique traitement efficace contre la schistosomiase, le Praziquantel. Néanmoins, l'utilisation ce dernier a favorisé l'émergence de souches parasitaires tolérantes. C'est pourquoi, il est devenu impératif d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, nécessaire au développement de nouveaux traitements contre la schistosomiase.

Les lysines désacétylases ou KDACs constituent des cibles thérapeutiques intéressantes, notamment parce que ce sont des enzymes impliquées dans des processus cellulaires essentiels tels que la régulation de l'expression des gènes et du cycle cellulaire ou encore la différenciation cellulaire. À ce jour, différents inhibiteurs de KDACs sont approuvés dans le traitement du cancer et d'autres sont en essais cliniques, essentiellement en oncologie (Eckschlager et al. 2017). Chez *S. mansoni*, trois KDACs de classe I ont été identifiées: HDAC 1, 3 et 8 (Oger et al. 2008). D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de KDACs a démontré qu'il était possible d'induire la mort des parasites en culture. Des études réalisées sur la protéine HDAC8 humaine et SmHDAC8 ont montré qu'il existait des différences significatives au niveau de la poche catalytique entre ces deux protéines (Marek et al. 2013). Ces données soulignent l'intérêt de développer des inhibiteurs spécifiques de SmHDAC8. Néanmoins, il est devenu essentiel de déterminer le rôle de SmHDAC8, dans la biologie du parasite ainsi que ses partenaires protéiques.

C'est pourquoi le premier objectif de ma thèse a été de mettre en évidence l'interactome de SmHDAC8 par criblage d'ADN complémentaire de schistosome adultes, réalisé en double hybride chez la levure d'une part et par spectrométrie de masse en immunoprécipitant la protéine native du ver adulte d'autre part. Parmi les partenaires de SmHDAC8 identifiés, plusieurs sont des acteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, du métabolisme, ou encore de la transcription de gènes.

De nombreuses protéines participant à la modulation de la dynamique du cytosquelette ont été également retrouvées ; des protéines structurales comme la tensine ou encore l'actine, et des protéines de signalisation comme la GTPase SmRho1 (Caby et al. 2017). L'identification de SmRho1 comme partenaire de SmHDAC8 et l'identification de l'interaction entre ces deux protéines est cohérente avec le rôle postulé de cette dernière dans la modulation du cytosquelette.

Dans la seconde partie de ma thèse, je me suis donc focalisée sur cette interaction inédite. Bien qu'aucuns travaux n'aient encore démontré que la GTPase RhoA était un substrat ou même un partenaire de l'enzyme HDAC8 chez l'Homme, il nous est apparu intéressant de caractériser cette interaction chez *S. mansoni* d'un point de vue moléculaire et fonctionnel. En outre, cette étude sera la première à mettre en évidence le rôle de SmHDAC8 dans la modulation de l'organisation du cytosquelette du schistosome *via* la voie de signalisation impliquant la GTPase SmRho1.

RESULTATS

Analyse de l'interactome de l'histone désacétylase 8 de *S. mansoni*

L'intérêt que nous portons à la protéine HDAC8 du parasite s'appuie sur plusieurs données que nous avons décrites précédemment. En effet rappelons qu'il a été montré, dans un modèle murin, que l'extinction du transcrite codant pour la protéine SmHDAC8, par ARNi réduit significativement la charge parasitaire (Marek *et al.*, 2013). De plus, la résolution de la structure 3D de SmHDAC8, par cristallographie aux rayons X a également mis en évidence des différences significatives avec la protéine humaine HsHDAC8, au niveau du domaine catalytique, permettant ainsi le développement d'inhibiteurs spécifiques.

Chez l'Homme, le rôle d'HDAC8 n'est pas bien connu mais de nombreux travaux ont permis d'identifier certains de ces substrats et partenaires. Les substrats non histones les plus décrits sont le récepteur ERR α et le membre du complexe cohésine SMC3. Par ailleurs, l'étude réalisée en 2015 par Olson *et al.*, a permis d'identifier 19 nouveaux substrats. Parmi les partenaires décrits, on retrouve des protéines impliquées dans le transport vésiculaire tels que NUP98 (NUclear Pore complex protein) et CPNE3 (Copine-3) ou encore des composants du cytosquelette (Joshi *et al.* 2013). Ainsi, de par les nombreux substrats et interactants qu'elle possède, HDAC8 semble essentielle à de nombreux processus cellulaires. Elle constitue aussi une cible thérapeutique prometteuse du fait de son implication dans la cancérogenèse.

Les processus de signalisation moléculaire impliquant SmHDAC8 ainsi que ses partenaires protéiques étant inconnus chez le schistosome, la caractérisation de l'interactome de cette enzyme a été entreprise.

Dans l'article qui suit, intitulé « Analysis of the interactome of *Schistosoma mansoni* histone deacetylase 8 », deux méthodologies différentes et complémentaires ont été utilisées : d'une part, le criblage en double hybride réalisé en levure utilisant une banque d'ADN complémentaire de schistosomes adultes, et d'autre part la co-immunoprécipitation de la protéine SmHDAC8 native issue de couples de vers adultes, couplée à une analyse par spectrométrie de masse. La première approche, nous a permis tout d'abord d'identifier les interactions protéine-protéine directes. Puis, la seconde a mis en évidence les partenaires pouvant également interagir directement avec SmHDAC8 mais aussi les membres de complexes protéiques impliquant l'enzyme. Nous avons ainsi démontré que SmHDAC8 possède de nombreux interactants nucléaires et cytoplasmiques, impliqués dans environ 40 processus cellulaires différents, incluant notamment la régulation du complexe cohésine, l'organisation du cytosquelette, la modulation de la transcription et de la traduction, le métabolisme, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, la déphosphorylation et enfin la protéolyse.

Cet article a été publié dans le journal *Plos Neglected Tropical Diseases*, en novembre 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006089>.

Analysis of the interactome of *Schistosoma mansoni* histone deacetylase 8

Stephanie Caby[✉], Lucile Pagliazzo[✉], Julien Lancelot, Jean-Michel Saliou, Nicolas Bertheaume, Raymond J. Pierce, Emmanuel Roger*

Univ. Lille, CNRS UMR 8204, INSERM U1019, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), F-59000 Lille, France

[✉] These authors contributed equally to this work.

Correspondence: *Emmanuel.Roger@univ-lille1.fr

Abstract

Background

Histone deacetylase 8 from *Schistosoma mansoni* (SmHDAC8) is essential to parasite growth and development within the mammalian host and is under investigation as a target for the development of selective inhibitors as novel schistosomicidal drugs. Although some protein substrates and protein partners of human HDAC8 have been characterized, notably indicating a role in the function of the cohesin complex, nothing is known of the partners and biological function of SmHDAC8.

Methodology/Principal findings

We therefore employed two strategies to characterize the SmHDAC8 interactome. We first used SmHDAC8 as a bait protein in yeast two-hybrid (Y2H) screening of an *S. mansoni* cDNA library. This allowed the identification of 49 different sequences encoding proteins. We next performed co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments on parasite extracts with an anti-SmHDAC8 antibody. Mass spectrometry (MS) analysis allowed the identification of 160 different proteins.

Conclusions/Significance

SmHDAC8 partners are involved in about 40 different processes, included expected functions such as the cohesin complex, cytoskeleton organization, transcriptional and translational regulation, metabolism, DNA repair, the cell cycle, protein dephosphorylation, proteolysis, protein transport, but also some proteasome and ribosome components were detected. Our results show that SmHDAC8 is a versatile deacetylase, potentially involved in both cytosolic and nuclear processes.

Introduction:

Schistosomiasis is a neglected tropical parasitic disease of major public health importance [1– 3] caused by blood flukes of the *Schistosoma* spp., with 258 million people requiring treatment worldwide, and 780 million at risk of infection (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>). There is currently no effective vaccine against schistosomiasis [4] and the treatment of the disease relies on a single drug, praziquantel (PZQ). Because of the intensive use of PZQ, field observations show the appearance of schistosome strains resistant to PZQ [5, 6]. Thus, the development of new drugs is imperative. We have used a “piggy-back” strategy that consists in identifying orthologues of proteins already targeted in other pathologies, like cancer. Among these, we have chosen to target enzymes involved in epigenetic processes [7] and in particular histone deacetylases (HDAC), which are among the most studied epigenetic targets. *Schistosoma mansoni* possesses three class I HDACs (SmHDAC1, 3 and 8) and four class II HDACs, two class IIa and two class IIb enzymes [8, 9]. We have shown [10] that Trichostatin A (TSA), a pan-inhibitor of HDACs, induces hyperacetylation of histones, deregulates gene expression and induces the death of schistosome larvae and adult worms in culture. Schistosome HDACs are therefore promising targets for the development of new drugs against schistosomiasis, especially SmHDAC8 [11, 12]. Indeed, it is the only schistosome class I HDAC for which the structure of its catalytic pocket differs significantly from that of the human orthologue [13], allowing the development of selective inhibitors that are toxic for schistosome larvae (apoptosis and death) and adult worms (changes in the reproductive organs, separation of worm pairs and arrest of egg laying) in culture [13–15]. Moreover, transcript knockdown of SmHDAC8 leads to markedly reduced parasite viability and fecundity [13] suggesting that this enzyme is essential to parasite growth and development. Human HDAC8 (HsHDAC8) catalyzes the deacetylation of lysine residues within histone and non-histone proteins but its biological role has long remained elusive [11]. The two best characterized non-histone substrates are the estrogen-related receptor (ERR α) and the structural maintenance chromosome 3 protein (SMC3). HsHDAC8 interacts directly with ERR α *in vivo* and deacetylates ERR α *in vitro*, increasing its DNA binding affinity [16]. In the case of SMC3, a member of the cohesin complex, HsHDAC8 is involved in its deacetylation that allows the recycling of the cohesin complex, and HsHDAC8 mutations are linked with the Cornelia deLange syndrome [17, 18]. Two recent studies using more systematic approaches identified novel HsHDAC8 substrates. The first [19] detected seven proteins all of which are nuclear proteins, including SMC3, and this approach failed to identify histones or ERR α as substrates. The second study [20] detected 19 novel HsHDAC8 substrates, not all of which were nuclear. Among them, the cohesin complex component SMC1A, but also all the protein substrates identified by Olson [19] were predicted by this approach. Clearly, each approach provides different information about the HsHDAC8 substrates. In order to characterize the protein partners of the 11 human HDACs, *Joshi et al.* [21] performed a global study of their interactions by establishing T-lymphoblast cell lines stably expressing Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-tagged hHDACs combined with proteomics and functional studies to identify hHDAC-containing protein complexes. They showed that in these cells HsHDAC8 interacts with 15 proteins: four related to the cell cycle including SMC1A and 3, three related to protein and ion transport and 8 with other/unknown functions. However, although these proteins are members of HsHDAC8-containing complexes, the methodology used cannot distinguish whether or not they interact directly

with the enzyme. Moreover, human acetylome analysis [22] interestingly reveals that among these partner proteins, SMC1A, SMC3, SA2, SEC16A and NUP98 are acetylated but only SMC1A and SMC3 have been identified as HsHDAC8 substrates [19, 20]. SmHDAC8 shows major structural differences compared to HsHDAC8, most obviously in the presence of insertions within the catalytic domain that form loops at the surface of the protein [13] and therefore represent potential surfaces for protein-protein interactions. We therefore sought to determine whether SmHDAC8 interacts with the same or different proteins than HsHDAC8. Since it is not possible to overexpress a tagged “bait” protein in schistosomes we decided to use two different methods to identify protein partners, yeast two-hybrid screening (Y2H) and co-immunoprecipitation experiments coupled to mass spectrometry (Co-IP/ MS). The former technique characterizes direct protein-protein interactions and the latter identifies proteins that may interact directly or are members of protein complexes that interact with the target protein. They therefore yield different results, but in combination give an overall picture of the cellular processes in which SmHDAC8 participates. Our results show that SmHDAC8 is a versatile deacetylase, potentially involved in both cytosolic and nuclear processes, and contribute to the understanding of its status as a therapeutic target.

Methods

Yeast two-hybrid screening.

A yeast two-hybrid (Y2H) *S. mansoni* adult worm (6-week-old male and female worms) cDNA library that consists of the Gal4-activation domain (Gal4-AD), amino acids 768–881, fused with *S. mansoni* adult worm cDNA was used. The cDNA library was constructed according to the manufacturer’s instructions (Matchmaker Library Construction and Screening Kit, Clontech) using the pGADT7 plasmid containing the LEU2 reporter gene. The cDNA library was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* AH109 strain containing HIS3/ADE2/LacZ reporter genes, under the conditions recommended by the supplier (Yeast Protocols Handbook, Clontech). The cDNA library was screened with a bait construct corresponding to the Gal4-DNA binding domain (Gal4-DBD) fused with the full-length coding sequence of SmHDAC8 (EF077628) [8], amplified using oligonucleotides SmHDAC8 Fw (5'-GCTCGAATTCATGTC TGGTGGGATCG-3') and SmHDAC8 Rw (5'-ACCTCGAGGATCCCATAACCAGTTAAAT TATA-3'), and cloned into the *EcoRI* and *BamHI* restriction sites of the pGBKT7 vector bearing the TRP1 reporter gene. The *S. cerevisiae* Y187 strain containing the Lac Z reporter gene was transformed with the bait construct and mated with the AH109 strain overnight. After incubation, diploid yeasts were plated on selective medium lacking adenine, histidine, leucine and tryptophan and the plates were incubated at 30°C for 5 days. Positive clones were confirmed both by restreaking on selective medium and by a liquid LacZ assay (Yeast Protocols Handbook, Clontech).

Extraction of plasmid from yeast cells and sequence analyses.

Each selected positive clone was cultivated in medium lacking leucine. Cells were harvested by centrifugation

RESULTATS

(2,000 g, 20 min) and disrupted with glass beads. Plasmid extraction was performed with the Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Plasmids extracted from yeast cells were then transformed in Subcloning Efficiency DH5 α competent cells (Invitrogen). Prior to sequencing (Eurofins Genomics), about 400 individual clones were pre-screened by digestion with the restriction enzymes HindIII and *EcoRV* and electrophoresis on agarose gels in order to select clones with unique restriction profiles and weed out duplicates.

Confirmation of selected clones.

After extraction of plasmids, each clone was transformed in the AH109 strain to confirm that the interaction was robust. The *S. cerevisiae* Y187 strain was transformed with the bait construct SmHDAC8 pGBKT7 and mated with the AH109 strain overnight. After incubation, diploid yeasts were plated first on selective medium lacking leucine and tryptophan and then on another higher stringency selective medium lacking adenine, histidine, leucine and tryptophan and the plates were incubated at 30°C.

Bioinformatics analyses of proteins identified by Y2H.

Sequence analyses (correction and alignment) were performed using Sequencher software (Gene Codes Corporation). Identification and functional annotation of SmHDAC8 interactors was performed using Blast 2GO software [23].

Ethics statement.

All animal experimentation was conducted 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 was approved by the committee for ethics in animal experimentation of the Nord-Pas de Calais region (Authorization No. AF/2009) and the Pasteur Institute of Lille (Agreement No. A59-35009).

Parasite material.

A Puerto Rican strain (NMRI) of *S. mansoni* is maintained in the laboratory using the intermediate snail host *Biomphalaria glabrata* and the definitive golden hamster host *Mesocricetus auratus*. *S. mansoni* adult worms were obtained by hepatic portal perfusion of hamsters infected six weeks previously [24].

Antibody production Purified recombinant SmHDAC8 (a kind gift from M. Marek and C. Romier, IGBMC, Strasbourg, France [13]) was used to generate rat polyclonal antiserum. Male Lou Rats were injected i.p. with 50 μ g of SmHDAC8 with alum adjuvant in a total volume of 500 μ L three times at two-week intervals. The rats were bled two weeks after the final injection. The monospecificity of the rat antiserum was controlled after SmHDAC8 immunoprecipitation from *S. mansoni* protein extract (see section below) and western blotting (S1 Fig).

Extraction and co-immunoprecipitation of proteins expressed in adult *S. mansoni*.

Three independent experiments were performed as follows. Adult worms (50 couples) were suspended in 500 μ L of lysis buffer (20 mM TrisHCl pH 7.4, 50 Mm NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton and protease inhibitors), crushed with a Dounce homogenizer and sonicated ten times for 30 s (maximum power, Bioruptorplus, Diagenode). After centrifugation, at 10,000g for 10 min at 4°C, immunoprecipitation of SmHDAC8 was performed using the Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the protein lysate (500 μ L) was pre-cleared by incubation with 20 μ L of IgG from rat serum crosslinked to protein-L Agarose beads (Thermo Scientific) for 2 h at 4°C on a rotator. Then, pre-cleared lysate was collected after centrifugation, at 1,000g for 1 min at 4°C, and incubated overnight at 4°C on a rotator, with 1 μ L of anti-SmHDAC8 antibodies or 1 μ L of IgG from rat serum as a control, bound to protein-L Agarose beads.

Mass-spectrometry proteomic analysis.

Protein samples were denatured at 100°C in 5% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10% glycerol, and 10 mM Tris pH 8 buffer for 3 min, and subsequently fractionated on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel. Electrophoretic migration was stopped when the protein sample had entered 1 cm into the separating gel. The gel was labelled briefly with Coomassie Blue, and five bands, containing the whole sample, were cut out. Digestion of proteins in the gel slices was performed as previously described [25]. Separation of the protein digests was carried out using an UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific). Peptides were automatically fractionated onto a commercial C18 reversed phase column (75 μ m \times 150 mm, 2 μ m particle, PepMap100 RSLC column, Thermo Fisher Scientific, temperature 35°C). Trapping was performed during 4 min at 5 μ L/min, with solvent A (98% H₂O, 2% ACN (acetonitrile) and 0.1% FA (formic acid)). Elution was carried out using two solvents A (0.1% FA in water) and B (0.1% FA in ACN) at a flow rate of 300 nL/min. Gradient separation was 3 min at 5% B, 37 min from 5% B to 30% B, 5 min to 80% B, and maintained for 5 min. The column was equilibrated for 10 min with 5% buffer B prior to the next sample analysis. Peptides eluted from the C18 column were analyzed by Q-Exactive instruments (Thermo Fisher Scientific) using an electrospray voltage of 1.9 kV, and a capillary temperature of 275°C. Full MS scans were acquired in the Orbitrap mass analyzer over the m/z 300–1200 range with a resolution of 35,000 (m/z 200) and a target value of 5.00E +05. The ten most intense peaks with charge state between 2 and 4 were fragmented in the HCD collision cell with normalized collision energy of 27%, and tandem mass spectra were acquired in the Orbitrap mass analyzer with resolution 17,500 at m/z 200 and a target value of 1.00E+05. The ion selection threshold was 5.0E+04 counts, and the maximum allowed ion accumulation times were 250 ms for full MS scans and 100 ms for tandem mass spectrum. Dynamic exclusion was set to 30 s.

CoIP/MS proteomic data analysis.

Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were processed and converted into *.mgf peak list format with Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). MS/MS data were interpreted using search engine Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK) installed on a local server. Searches were performed with a

RESULTATS

tolerance on mass measurement of 0.2 Da for precursor and 0.2 Da for fragment ions, against a composite target decoy database (25,970 total entries) built with the *S. mansoni* Uniprot database (taxonomy id 6183, 12,861 entries) fused with the sequences of recombinant trypsin and a list of classical contaminants (124 entries). Up to one trypsin missed cleavage was allowed. For each sample, peptides were filtered out according to the cut-off set for protein hits with one or more peptides longer than nine residues, an ion score >30, an identity score >6, leading to a protein false positive rate of 0.8%.

Accession numbers

Human HDAC8 (UniProtKB Q9BY41) Human ERR α (UniProtKB P11474)

Human SMC3 (UniProtKB Q9UQE7) Human EF1 α 1 (UniProtKB P68104)

Human SMC1A (UniProtKB Q14683)

Human SA2/STAG2 (UniProtKB Q8N3U4)

Human SEC16A (UniProtKB O15027)

Human NUP98 (UniProtKB P52948)

Human RAD21 (UniProtKB O60216)

Human PA2G4/Ebp1 (UniProtKB Q9UQ80)

Human CtBP (UniProtKB Q13363)

Human MBD2 (UniProtKB Q9UBB5)

Human RbAp46 (UniProtKB Q16576)

Human RbAp48 (UniProtKB Q09028)

Human MTA2 (UniProtKB O94776)

Human Cortactin (UniProtKB Q14247)

Human Anillin (UniProtKB Q9NQW6)

Human Gelsolin (UniProtKB P06396)

Human CapZ (UniProtKB P52907)

Human profilin (UniProtKB P07737)

Human Arp2/3 complex 1B (UniProtKB O15143)

Human Arp2/3 complex 2 (UniProtKB O15144)

Human Arp2/3 complex 3 (UniProtKB O15145)

Human Arp2/3 complex 4 (UniProtKB P59998)

Human RhoA (UniProtKB P61586)

Results and discussion

The aim of our study was to identify SmHDAC8 partners in order to better apprehend its biological role and function. We used here two strategies to characterize the SmHDAC8 interactome. The yeast two-hybrid (Y2H) screening using SmHDAC8 revealed a large number of positive clones, of which we sequenced 137 after the

RESULTATS

prescreening step. After manual correction and assembly using Sequencher, we characterized 49 different sequences, which were then identified and functionally annotated using Blast 2GO software (S1 Table). Three independent co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments were performed, using an anti-SmHDAC8 antibody (named IP1, IP2, and IP3). As a control, we performed Co-IP with a rat IgG antibody alone in each experiment. Mass spectrometry (MS) of the Co-IP proteins identified 1,500 different proteins (S2 Table). A significant degree of variation between the proteins identified in each experiment was noted, for which several reasons can be invoked. The three parasite protein extracts were each obtained from a pool of *S. mansoni* adult worms of both sexes and not from homogeneous cell cultures. Variations in protein expression between worm batches could induce differences between the three Co-IP/MS experiments. Moreover, *S. mansoni* is a complex multicellular parasite and protein quantities can vary between the different cellular types within a given individual as well as between different worms. Therefore, to take account of this relative variability between each extract, we chose to pool the results obtain for the three Co-IP/MS experiments IP1, IP2 and IP3. The possibility that the observed variability may have been due to non-specific interactions of our anti-SmHDAC8 antibody with other proteins can be discounted. A single band corresponding to the molecular weight of SmHDAC8 was detected on western blots of the immunoprecipitated material (S1 Fig) and the only HDAC detected by MS in the immunoprecipitates was SmHDAC8 (S2 Table). Of the 1,500 proteins for which peptides were detected we selected only those that fulfilled three criteria: (i) at least three peptides in the Co-IP experiment, (ii) with no more than two peptides in the control and (iii) with a spectral count ratio between CoIP SmHDAC8 and control of greater than 3. After, this selection step we obtained 160 different proteins that were considered good candidates as SmHDAC8 partners (S2 Table). Among the proteins identified by these two approaches, four are common between Y2H and Co-IP/MS: the Proliferation-associated protein 2G4, 38kDa (PA2G4, n°G4LXR6), Cathepsin-B1 (SmCB1, n°Q8MNY2), putative NADH-ubiquinone oxidoreductase (n°G4VK53) and microsomal glutathione S-transferase 3 (GST-3, n°G4VH65) (Fig 1). Among these proteins, two illustrate the previously characterized roles in HDAC-dependent processes and/or the potential involvement of acetylation. (i) PA2G4 is highly conserved in eukaryotes. The human member of this family, ErbB3 binding protein 1 (Ebp1) was identified as a putative downstream member of an ErbB3-regulated signal transduction pathway [26]. More particularly, the C-terminal region (300–372) of Ebp1, which is important for transcriptional repression, was shown to bind HDAC2 and inhibitors of HDACs significantly reduced Ebp1-mediated transcriptional repression [27, 28]. Like its human counter part, the interaction between PA2G4 and SmHDAC8 is mediated by its C-terminal moiety, corresponding to the fragment cloned in the Y2H screen. (ii) SmCB1 is an essential gut-associated peptidase that digests host blood proteins as a source of nutriment (note that we also detected, but only with the Co-IP/MS experiments, cathepsin D and L2 which are also part of the gut peptidase network) and is also a drug target because enzyme inhibition induced severity phenotypes in the parasite [29]. Moreover, SmCB1 is a promising vaccine candidate because its administration elicits protection against *S. mansoni* challenge infection in mice and hamsters [30, 31]. A direct link with HDACs has never been reported. Nevertheless, acetylome analysis from *Schistosoma japonicum* reveals that Cathepsin-B (n°Q7Z116) is acetylated on K241 and sequence alignments between SjCB1 and SmCB1 show that it is conserved. The lack of convergence between Y2H screening and Co-IP/MS is

RESULTATS

perhaps not entirely surprising since they represent very different methods for interactome studies. Both strategies have weaknesses. In Y2H screening, direct interactions between two proteins are detected, but in some cases, these may be non-specific due to the juxtaposition of proteins or fragments that are never in contact within the cell. In the case of Co-IP/MS, some proteins cannot be identified because they are present in low quantities in the parasite extract and some proteins identified may be members of immunoprecipitated complexes and are not direct partners. The results obtained can therefore be considered as complementary and, taken together, provide an overall picture of the cellular processes in which SmHDAC8 is involved.

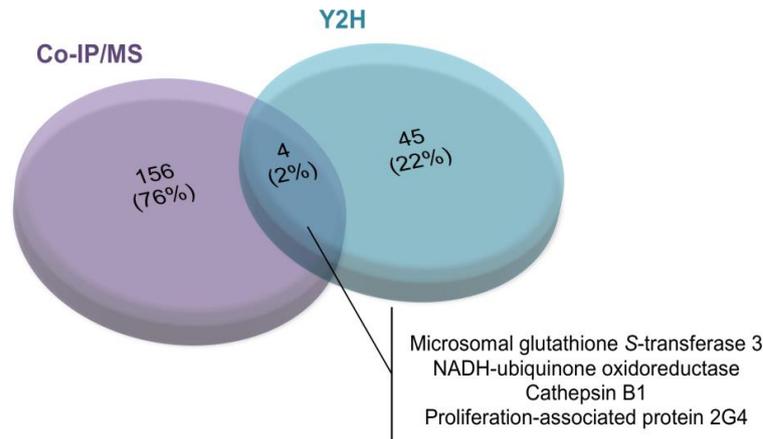


Fig 1: Venn diagram presenting the proteins identified by Y2H and Co-IP/MS as SmHDAC8 interactors.

Forty-nine and 160 different proteins were identified by Y2H and Co-IP/MS respectively. Four proteins are common between Y2H and Co-IP/MS: the Proliferation-associated protein 2G4, 38kDa (PA2G4, n°G4LXR6), Cathepsin-B1 (SmCB1, n°Q8MNY2), putative NADH-ubiquinone oxidoreductase (n°G4VK53) and microsomal glutathione S-transferase 3 (GST-3, n°G4VH65).

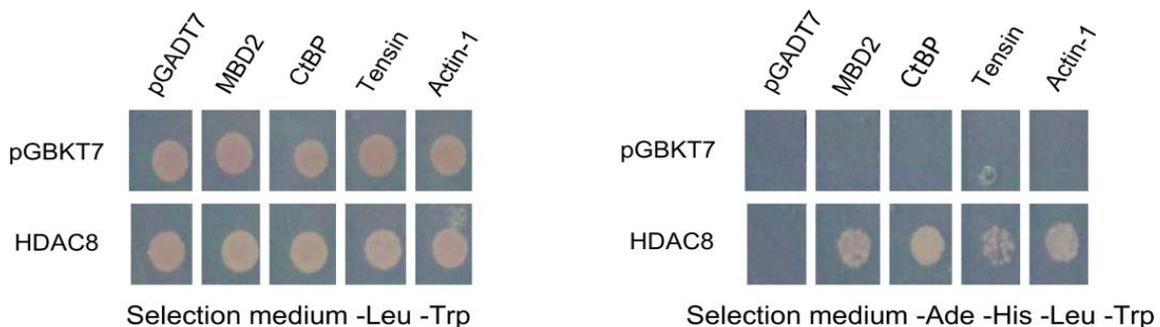


Fig 2: Confirmation of interactions by candidate-specific Y2H experiments.

In order to confirm the screening results, the isolated clones CtBP, MBD2, tensin and actin-1 (cloned into pGADT7 vector) transformed in the AH109 strain were mated with the bait construct SmHDAC8 pGBKT7 transformed in the Y187 strain. After incubation, diploid yeasts were plated on selective medium lacking leucine and tryptophan (left panel) and then on another high stringency selective medium lacking adenine, histidine, leucine and tryptophan (right panel) showing, as expected, that SmHDAC8 interacts with the clones tested.

For some of the partner proteins identified only by Y2H and not by Co-IP/MS screening we carried out independent experiments to verify the interaction with SmHDAC8. For instance, the binding of SmCtBP, SmMBD2, tensin and actin-1 proteins to SmHDAC8 was verified by candidate-specific Y2H experiments. As

expected, SmHDAC8 indeed interacted with SmCtBP and SmMBD2, as well as the other two proteins (Fig 2). These results re in agreement with available data for the human orthologues. (i) The human C terminal binding protein (CtBP) family members appear to mediate transcriptional repression in a histone deacetylase (HDAC)-dependent manner [32]. Some human class I HDACs, HDAC 1, 2 and 3 [33–35] and class II HDACs (HDAC4 and 5) [36] are present in the CtBP1 nuclear protein complex, but the possible involvement of HsHDAC8 was not investigated. (ii) The methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) binds to methylated DNA and represses transcription through the recruitment of NuRD co-repressor complex [37].

The MBD2-NuRD complex contains a histone deacetylase core composed of HDAC1/2, RbAp46/48 and MTA2 [38–41]. The MBD2 protein possesses, among others, an intrinsically disordered region (IDR) able to recruit RbAp48, HDAC2 and MTA2 [42]. More particularly, it is possible that HDACs bind directly to the MBD2 IDR, because the human HDAC interactome study reveals a specific interaction between MBD2 and HDAC1/2 [21]. The Database of Protein Disorders (DisProt, www.disprot.org) [43] predicts an IDR domain located between the MBD and the C-terminal coiled-coil domains of SmMBD2, which may be involved in SmHDAC8 binding. Focusing on the biological processes predicted with the blast2GO software for each protein identified, among the 49 partners identified with the Y2H screening (S1 Table), seven were of unknown function, although one encoded a peptide including an EGF-like domain and an IgG-like domain. One further sequence corresponded to a hitherto unannotated gene. The remaining proteins are involved in 21 different biological processes (S1 Table), and those represented by the largest numbers of different sequences are cytoskeleton organization, transcription regulation, metabolism, transport, cell cycle regulation, DNA repair and chromatin remodeling (Fig 3). The 160 proteins identified by Co-IP/MS (S2 Table) are involved in 33 different biological processes, and those represented by the most different sequences are metabolic process, cytoskeleton organization, proteasome, proteolysis, translation regulation, transport, protein dephosphorylation and stress response (Fig 3). These results show that some of these processes (22%) are common between our different experiments, and in particular metabolism and cytoskeleton organization (Fig 3). Moreover, they suggest that SmHDAC8 is a versatile deacetylase involved in both cytosolic (cytoskeleton organization, ribosome, proteolysis or proteasome) and nuclear (transcription regulation, DNA binding and repair, chromatin remodeling or cohesin complex) processes. This contrasts with the current knowledge of partners and substrates proteins of human HDAC8 (HsHDAC8) that emphasizes nuclear functions. The global interactome study [21] that identified 15 partner proteins and the recent systematic studies of HsHDAC8 substrates [19, 20] mainly identified nuclear partner proteins involved in the cohesin complex, transcriptional regulation and chromatin remodeling. Some extranuclear proteins were identified as partners, such as the Ca²⁺-dependent phospholipid binding protein Copine III [21] or substrates, such as the elongation factor 1 EF1 α 1 [20] but these were in the minority. Here, the involvement of SmHDAC8 in extranuclear functions is illustrated by the direct interaction between SmHDAC8 and proteins involved in cytoskeleton organization like tensin, actin-1, actin 5c and Rho1 GTPase (S1 and S2 Tables). As previously mentioned, the binding of tensin and actin-1 proteins to SmHDAC8 was verified by candidate-specific Y2H experiments. As expected, SmHDAC8 indeed interacted with SmActin-1 and SmTensin (Fig 2). Interestingly, Waltregnyetal, have shown that HsHDAC8

RESULTATS

interacts with smooth muscle alpha actin (but not beta-actin) to regulate cell contractility [44, 45]. Proteomic analyses have shown that all three human actin isoforms (alpha, beta and gamma) are acetylated [22, 46]. Moreover, the actin-associated proteins cortactin [47] and anillin [20] are HsHDAC8 substrates. Several regulatory proteins of actin polymerization in human are also acetylated (gelsolin, CapZ, profilin and the Arp2/3 complex) [22] and we found some orthologues in our SmHDAC8 Co-IP/ MS analyses (gelsolin, septin and a subunit of the Arp2/3 complex, S2 Table). Actin dynamics are also controlled by small GTPases of the Rho family, like RhoA, notably in the formation of focal adhesions and stress fibers [48–50]. RhoA was not identified by Joshi et al [21] as interacting with HsHDAC8 and does not seem to be acetylated in human [22], although it was found to be acetylated in *Schistosoma japonicum* [51]. Here, our Y2H screen shows the direct interaction between SmHDAC8 and SmRho1, the orthologue of human RhoA. Hence, it is possible that binding of SmHDAC8 to SmRho1 could participate in the control of the SmRho1 pathway.

Among all the HsHDAC8 substrates and partners identified [19–21], only Sec proteins, involved in endoplasmic reticulum protein secretory pathways were also found to interact with SmHDAC8, although these are different and phylogenetically distinct proteins: Sec16A in human and Sec1 and Sec61 β in *S. mansoni* (S2 Table).

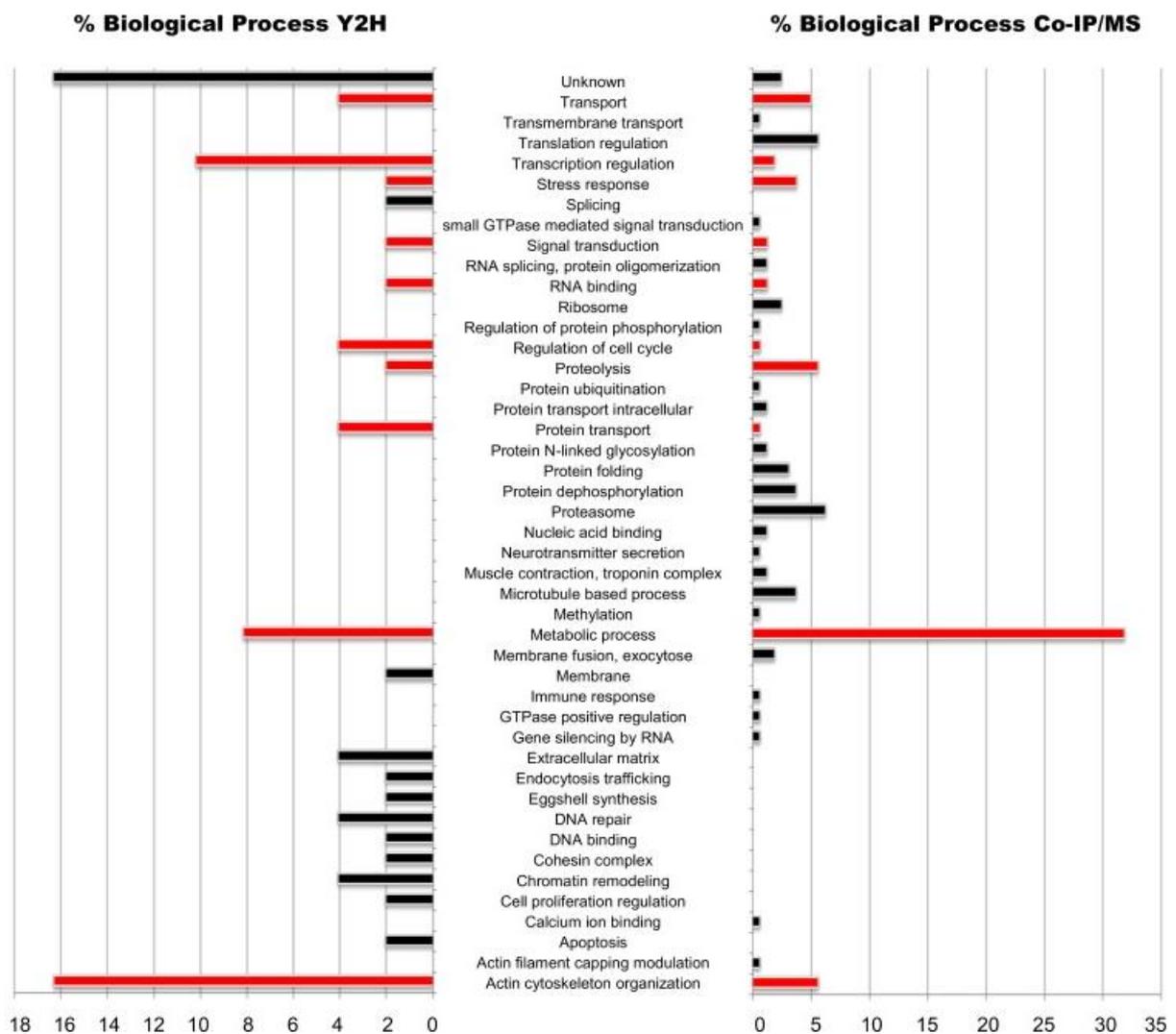


Fig 3: Biological processes involving the proteins identified by Y2H and Co-IP/MS as SmHDAC8 interactors.

Histogram (left for Y2H and right for Co-IP/MS) showing the biological processes in which the identified protein partners of SmHDAC8 are involved. The processes were defined using the Blast2GO software. Bars represent the protein percentage belonging to one biological process. Red and black bars highlight common and specific processes between Y2H and Co-IP/MS, respectively.

Strikingly, we found no orthologues of the major HsHDAC8 substrates/partners already characterized among the protein partners of SmHDAC8. This is exemplified by members of the cohesin complex, which is notably responsible for the correct separation of sister chromatids into two daughter cells during mitosis [52]. The tripartite cohesin ring is formed by two SMC (structural maintenance of chromosome) proteins SMC1A and SMC3, and the α -kleisin subfamily protein RAD21 [53–55]. Both SMC3 and SMC1A were found in the HsHDAC8 interactome [21], as is SA2 (an accessory protein that binds to hRAD21). In their study, hRAD21 was also detected, but at a non-significant level.

Unexpectedly, we did not identify any of the cohesin complex members present in *S. mansoni* using our Co-IP/MS strategy contrary to *Joshi et al.* One possible explanation is that they used cells overexpressing EGFP-tagged hHDACs that generated a higher quantity of HsHDAC8 protein than is present under physiological conditions. Correct MS identification depends strongly on the quantity of immunoprecipitated protein, and unfortunately, we are unable to increase SmHDAC8 expression in *S. mansoni*. However, and interestingly, our Y2H screen shows a direct interaction of SmHDAC8 with SmRAD21. In order to confirm the Y2H screening result we carried out a candidate-specific Y2H experiment with the SmRAD21 clone and, as expected, SmHDAC8 interacts with SmRAD21, suggesting that SmHDAC8 forms an integral part of the cohesin complex and may have a central role in cell division, transcriptional regulation and DNA repair. In conclusion, the protein partners of SmHDAC8 identified by our Y2H library screen and Co-IP/MS experiments are all orthologues of proteins not previously identified as substrates or partners of human HDAC8. While we did not necessarily expect to detect substrates using these methodologies, it is striking that none of the partner proteins detected by *Joshi et al.* were among the SmHDAC8 partners. We propose that the principal reason for this is that the methodology used in the previous study, with tagged HDACs (as bait to pull down protein complexes) expressed in a T-lymphoblast cell line, may address a limited subset of potential partners. In contrast, our Co-IP/MS study was performed on adult worm protein extracts and *S. mansoni* is a complex parasite encompassing a variety of cell types. These Co-IP/MS approaches do not necessarily identify the proteins to which the HDACs physically bind because some proteins identified can be part of immunoprecipitated complexes. This is illustrated by the cohesin complex members identified by *Joshi et al.* (SMC1A, SMC3, and SA2) and that do not include RAD21, which only appeared as a non-significant binder. This is the reason why we also performed an Y2H screen using SmHDAC8 in order to identify proteins that bound directly to SmHDAC8. Our Y2H shows that SmHDAC8 physically binds to SmRAD21 and we suggest that the other cohesin complex components are pulled down by this interaction. Against this, it can be argued that the Y2H screen can identify non-specific interactions due to the juxtaposition of proteins or fragments that are never in contact within the cell. Again, this is why we have followed up the results of the initial screen with more detailed investigations of the interactions of two of the most interesting candidates,

SmRAD21 and SmRho1, allowing us to confirm that both are bona fide partners of SmHDAC8. Despite the fact that we did not identify the same protein partners as *Joshi et al*, it would be unwise to assume that all those identified in the Y2H screen and in the Co-IP/MS experiment are specific for the schistosome enzyme. It is probable that a number of their human orthologues will interact with HsHDAC8 when investigated individually. Nevertheless, given the structural differences between the schistosome and human enzymes, and particularly the unstructured loops at the surface of SmHDAC8, encoded by insertions in the catalytic domain sequence, it can be assumed that specific partners of the latter are present. Some of the proteins we identified have no human orthologues and have unknown functions. Further work will determine which of the partner proteins are schistosome-specific, how they interact with SmHDAC8 and the role of these interactions within the parasite.

Supporting information

S1 Fig. Rat antiserum anti-SmHDAC8 evaluation. The monospecificity of the rat antiserum was controlled after SmHDAC8 immunoprecipitation from *S. mansoni* protein extract followed by western blotting using the same antibody (IP SmHDAC8) and under the same conditions as used for the Co-IP/MS experiments. Control lanes are the *S. mansoni* adult worm extract used for the immunoprecipitation (input) and an immunoprecipitation with rat IgG (mock). The faint band at ~37kDa in the IP SmHDAC8 lane is also present in the control (mock) lane. (TIFF)
 S1 Table. SmHDAC8 partners from Y2H screening. Identification and functional annotation of SmHDAC8 interactors was performed using Blast 2GO software. (XLS)
 S2 Table. SmHDAC8 partners from Co-IP/MS analysis. Sheet "IP1-IP2-IP3 full list" contains the 1,500 different proteins identified from the three independent Co-IP/MS experiments IP1, IP2, IP3 respectively. Sheets "IP1 screen", "IP2 screen" and "IP3 screen" contain the 57, 65 and 51 different proteins obtained after the selection step (cf. manuscript for details) for IP1, IP2 and IP3 respectively. Sheet "160 selected proteins" contains the 160 different proteins from IP1, IP2 and IP3. (XLSX)

References

1. Gryseels B., Polman K., Clerinx J. & Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet*. 368, 1106–18 (2006). [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3) PMID: 16997665.
2. Hotez P. J. A plan to defeat neglected tropical diseases. *Sci Am*. 302, 90–4, 96 (2010). PMID: 20063641.
3. Utzinger J. & Keiser J. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother*. 5, 263–85 (2004). <https://doi.org/10.1517/14656566.5.2.263> PMID: 14996624.
4. Siddiqui A. A., Siddiqui B. A. & Ganley-Leal L. Schistosomiasis vaccines. *Hum Vaccin*. 7, 1192–7 (2011). <https://doi.org/10.4161/hv.7.11.17017> PMID: 22048120.

RESULTATS

5. Doenhoff M. J., et al. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology*. 136, 1825–35 (2009). <https://doi.org/10.1017/S0031182009000493> PMID: 19281637.
6. Fenwick A., Savioli L., Engels D., Robert Bergquist N. & Todd M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 19, 509–15 (2003). PMID: 14580962.
7. Pierce R. J., et al. Chromatin regulation in schistosomes and histone modifying enzymes as drug targets. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106, 794–801 (2011). PMID: 22124550.
8. Oger F., et al. The class I histone deacetylases of the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *BiochemBiophysRes Commun.* 377, 1079–84 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.090> PMID: 18977200.
9. Scholte L. L. S., et al. Evolutionary relationships among protein lysine deacetylases of parasites causing neglected diseases. *Infect Genet Evol.* 53, 175–188 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.05.011> PMID: 28506839.
10. Dubois F., et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. *MolBiochemParasitol.* 168, 7–15 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.06.001> PMID: 19538992.
11. Chakrabarti A., et al. HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions. *Trends Pharmacol Sci.* 36, 481–92 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.013> PMID: 26013035.
12. Pierce R. J., Dubois-Abdeselem F., Lancelot J., Andrade L. & Oliveira G. Targeting schistosome histone modifying enzymes for drug development. *Curr Pharm Des.* 18, 3567–78 (2012). PMID: 22607147.
13. Marek M., et al. Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoSPathog.* 9, e1003645 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003645> PMID: 24086136.
14. Heimburg T., et al. Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting HDAC8 from *Schistosoma mansoni* for the Treatment of Schistosomiasis. *J Med Chem.* 59, 2423–35 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01478> PMID: 26937828.
15. Stolfa D. A., et al. Molecular basis for the antiparasitic activity of a mercaptoacetamide derivative that inhibits histone deacetylase 8 (HDAC8) from the human pathogen *Schistosoma mansoni*. *J Mol Biol.* 426, 3442–53 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.03.007> PMID: 24657767.
16. Wilson B. J., Tremblay A. M., Deblois G., Sylvain-Drolet G. & Giguere V. An acetylation switch modulates the transcriptional activity of estrogen-related receptor alpha. *MolEndocrinol.* 24, 1349–58 (2010). <https://doi.org/10.1210/me.2009-0441> PMID: 20484414.
17. Deardorff M. A., et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature.* 489, 313–7 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11316> PMID: 22885700

18. Decroos C., et al. Biochemical and structural characterization of HDAC8 mutants associated with Cornelia de Lange syndrome spectrum disorders. *Biochemistry*. 54, 6501–13 (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00881> PMID: 26463496.
19. Olson D. E., et al. An unbiased approach to identify endogenous substrates of "histone" deacetylase 8. *ACS Chem Biol*. 9, 2210–6 (2014). <https://doi.org/10.1021/cb500492r> PMID: 25089360 20.
20. Alam N., et al. Structure-Based Identification of HDAC8 Non-histone Substrates. *Structure*. 24, 458–68 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.02.002> PMID: 26933971.
21. Joshi P., et al. The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family. *MolSyst Biol*. 9, 672 (2013). <https://doi.org/10.1038/msb.2013.26> PMID: 23752268.
22. Choudhary C., et al. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 325, 834–40 (2009). <https://doi.org/10.1126/science.1175371> PMID: 19608861 23.
23. Conesa A., et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 21, 3674–6 (2005). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610> PMID: 16081474.
24. Smithers S. R. & Terry R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*. 55, 695–700 (1965). PMID: 4957633.
25. Miguet L., et al. Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J ProteomeRes*. 8, 3346– 54 (2009). <https://doi.org/10.1021/pr801102c> PMID: 19413345.
26. Yoo J. Y., et al. Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB-3 and regulation of this binding by heregulin. *Br J Cancer*. 82, 683–90 (2000). <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.0981> PMID: 10682683.
27. Zhang Y., Woodford N., Xia X. & Hamburger A. W. Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*. 31, 2168–77 (2003). PMID: 12682367.
28. Zhang Y. & Hamburger A. W. Heregulin regulates the ability of the ErbB3-binding protein Ebp1 to bind E2F promoter elements and repress E2F-mediated transcription. *J Biol Chem*. 279, 26126–33 (2004). <https://doi.org/10.1074/jbc.M314305200> PMID: 15073182 29.
29. Jilkova A., et al. Structural basis for inhibition of cathepsin B drug target from the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *J BiolChem*. 286, 35770–81 (2011). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271304> PMID: 21832058 30.
30. El Ridi R., et al. Cysteine peptidases as schistosomiasis vaccines with inbuilt adjuvanticity. *PLoS One*. 9, e85401 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085401> PMID: 24465551.
31. Tallima H., et al. Protective immune responses against *Schistosoma mansoni* infection by immunization with functionally active gut-derived cysteine peptidases alone and in combination with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *PLoS Negl Trop Dis*. 11, e0005443 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005443> PMID: 28346516.
32. Chinnadurai G. CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol Cell*. 9, 213–24 (2002). PMID: 11864595 33.

33. Koipally J. & Georgopoulos K. Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem.* 275, 19594–602 (2000). <https://doi.org/10.1074/jbc.M000254200> PMID: 10766745.
34. Subramanian T. & Chinnadurai G. Association of class I histone deacetylases with transcriptional corepressor CtBP. *FEBS Lett.* 540, 255–8 (2003). PMID: 12681518 35.
35. Sundqvist A., Sollerbrant K. & Svensson C. The carboxy-terminal region of adenovirus E1A activates transcription through targeting of a C-terminal binding protein-histone deacetylase complex. *FEBS Lett.* 429, 183–8 (1998). PMID: 9650586.
36. Zhang C. L., McKinsey T. A., Lu J. R. & Olson E. N. Association of COOH-terminal-binding protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor. *J Biol Chem.* 276, 35–9 (2001). <https://doi.org/10.1074/jbc.M007364200> PMID: 11022042.
37. Feng Q. & Zhang Y. The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev.* 15, 827–32 (2001). <https://doi.org/10.1101/gad.876201> PMID: 11297506.
38. Brackertz M., Gong Z., Leers J. & Renkawitz R. p66 alpha and p66 beta of the Mi-2/NuRD complex mediate MBD2 and histone interaction. *Nucleic Acids Res.* 34, 397–406 (2006). <https://doi.org/10.1093/nar/gkj437> PMID: 16415179.
39. Denslow S. A. & Wade P. A. The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene.* 26, 5433–8 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210611> PMID: 17694084.
40. Zhang Y., LeRoy G., Seelig H. P., Lane W. S. & Reinberg D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell.* 95, 279–89 (1998). PMID: 9790534.
41. Zhang Y., et al. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* 13, 1924–35 (1999). PMID: 10444591.
42. Desai M. A., et al. An intrinsically disordered region of methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) recruits the histone deacetylase core of the NuRD complex. *Nucleic Acids Res.* 43, 3100–13 (2015). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv168> PMID: 25753662.
43. Sickmeier M., et al. DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Res.* 35, D786–93 (2007). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl893> PMID: 17145717.
44. Waltregny D., et al. Expression of histone deacetylase 8, a class I histone deacetylase, is restricted to cells showing smooth muscle differentiation in normal human tissues. *Am J Pathol.* 165, 553–64 (2004). [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63320-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63320-2) PMID: 15277229.
45. Waltregny D., et al. Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *Faseb J.* 19, 966–8 (2005). <https://doi.org/10.1096/fj.042303fje> PMID: 15772115.

RESULTATS

46. Kim S. C., et al. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*. 23, 607–18 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.026> PMID: 16916647.
47. Li J., et al. Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*. 307, C288–95 (2014). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00102.2014> PMID: 24920679
48. Bishop A. L. & Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 348 Pt 2, 241–55 (2000).
49. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 279, 509–14 (1998). PMID: 9438836
50. Hall A. Rho family GTPases. *BiochemSoc Trans*. 40, 1378–82 (2012). <https://doi.org/10.1042/BST20120103> PMID: 23176484
51. Hong Y., et al. Proteome-wide analysis of lysine acetylation in adult *Schistosoma japonicum* worm. *J Proteomics*. 148, 202–12 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.008> PMID: 27535354
52. Seitan V. C. & Merkschlager M. Cohesin and chromatin organisation. *Curr Opin Genet Dev*. 22, 93– 100 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.11.003> PMID: 22155130.
53. Peters J. M., Tedeschi A. & Schmitz J. The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev*. 22, 3089–114 (2008). <https://doi.org/10.1101/gad.1724308> PMID: 19056890.
54. Schleiffer A., et al. Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol Cell*. 11, 571–5 (2003). PMID: 12667442.
55. Zhang N., et al. A handcuff model for the cohesin complex. *J Cell Biol*. 183, 1019–31 (2008). <https://doi.org/10.1083/jcb.200801157> PMID: 19075111.

Partie I : Analyse de l'interactome de l'histone désacétylase 8 de *S. mansoni* : CONCLUSIONS

La protéine SmHDAC8 semble essentielle au développement du parasite et sa survie chez l'hôte mammifère. Cependant, son rôle biologique n'a pas encore été mis en évidence. Ainsi, dans le but d'identifier les partenaires de SmHDAC8, deux stratégies ont été utilisées : le criblage d'une banque d'ADNc de schistosomes adultes, réalisé en double hybride chez la levure (Y2H) et la co-immunoprécipitation de protéine SmHDAC8 issue de couple de vers adultes, analysée en spectrométrie de masse (Co-IP/MS). Trois expériences de co-IP/MS ont été réalisées et une importante variabilité dans les protéines identifiées a été observée. Ceci peut s'expliquer par les différences d'expression des protéines entre les différents lots de couples de vers utilisés. De plus, *S. mansoni* est un parasite pluricellulaire complexe dont les quantités de protéines vont varier entre les différents types cellulaires chez un même ver. C'est pourquoi, les résultats obtenus pour les trois expériences de Co-IP/MS ont été mis en commun. Après une étape de sélection, nous avons obtenu 160 protéines différentes considérées comme de bons candidats en tant que partenaires de SmHDAC8 par CoIP/MS et le criblage en double hybride de levures, nous a permis de caractériser 49 séquences différentes. Parmi les protéines identifiées à l'aide de ces deux méthodologies, quatre sont communes : la PA2G4, la Cathepsine-B1, la NADH déshydrogénase et la GST-3. Remarque intéressante, les partenaires protéiques de SmHDAC8 retrouvés dans cette étude sont tous des orthologues de protéines non identifiées comme substrats ou partenaires de l'enzyme HDAC8 humaine. Il est également possible que ces protéines soient spécifiques de l'enzyme parasitaire. C'est pourquoi, d'autres investigations devraient nous permettre de déterminer quelles protéines partenaires sont retrouvées uniquement chez le parasite ainsi que leur rôle dans la biologie de *S. mansoni*.

En conclusion, cette étude a mis en évidence un ensemble de protéines partenaires potentielles jouant un rôle dans environ 40 processus cellulaires différents. De plus, nos résultats démontrent l'implication de SmHDAC8 à la fois dans des processus nucléaires et cytosoliques ainsi que la polyvalence de cette enzyme, soulignant son rôle essentiel chez le parasite et son potentiel en tant que cible thérapeutique.

PARTIE II

Rôle de SmHDAC8 dans la regulation du cytosquelette: caractérisation de l'interaction entre SmHDAC8 et la GTPase SmRho1

Introduction

La schistosomiase est la seconde endémie parasitaire mondiale après le paludisme et fait partie des 17 principales maladies tropicales négligées recensées par l'OMS. Il existe actuellement un unique traitement efficace contre la schistosomiase, le Praziquantel. Néanmoins, ce médicament ne prévient pas de la réinfestation et son utilisation en monothérapie, de façon massive et répétée, a favorisé l'émergence de souches parasitaires tolérantes (Crellen *et al.* 2016). Le développement de nouveaux médicaments ainsi que l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques sont donc devenus nécessaires. L'étude des mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'expression des gènes au cours du développement du parasite *S. mansoni* a permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs acteurs dont les lysines désacétylases ou KDACs. Les précédentes recherches de l'équipe ont abouti à l'identification et la caractérisation de trois KDACs de classe I chez *S. mansoni* : HDAC 1, 3 et 8 (Oger *et al.*, 2008). L'utilisation d'inhibiteurs de KDACs a également démontré qu'il était possible d'induire l'apoptose et la mort des parasites en culture (Dubois *et al.*, 2009). De plus, il a été montré, dans un modèle murin, que l'extinction du transcrite codant pour la protéine de SmHDAC8, par ARN interférence (ARNi), réduisait significativement la charge parasitaire (Marek *et al.*, 2013). Les projets SetTRéND et A-ParaDDisE financés par la Commission Européenne ont eu pour objectifs d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques chez le parasite en se focalisant sur les enzymes modifiant les histones et de développer des inhibiteurs sélectifs de KDAC(s), et notamment de la protéine SmHDAC8. La résolution de la structure de SmHDAC8, par cristallographie aux rayons X a montré des différences significatives avec la protéine humaine HDAC8, au niveau de sa poche catalytique, permettant ainsi l'identification d'inhibiteurs sélectifs (Marek *et al.*, 2013, Heimburg *et al.*, 2016). Ces inhibiteurs ont une toxicité pour le parasite *in vitro* et *in vivo* et sont des précurseurs potentiels de nouveaux médicaments contre la schistosomiase.

Afin d'étudier le rôle de SmHDAC8 dans la biologie du parasite, l'interactome de l'enzyme a été réalisée (Caby *et al.* 2017. Cf : Résultats : Partie I) et parmi les candidats identifiés, la GTPase SmRho1 a retenu notre attention.

Les GTPases Rho sont des petites protéines G monomériques appartenant à la superfamille Ras (Rat Sarcoma) (Hanna *et al.*, 2013). Ces protéines fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires de la signalisation intracellulaire puisqu'elles possèdent deux conformations réversibles ; une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Le cycle d'activation des RhoGTPases est étroitement régulé par trois classes de protéines : les régulateurs négatifs constitués des GAPs (*GTPase-Activating Proteins*), des GDIs (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) et les GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) qui sont des régulateurs positifs. L'activation des RhoGTPases *via* l'action des régulateurs est déclenchée en réponse à différents signaux extracellulaires, comme l'activation des intégrines, du TCR (*T Cell Receptor*), des récepteurs à activité tyrosine kinase ou couplés aux protéines G (Price *et al.*, 1998 ; Bar-Sagi *et Hal.*, 2000 ; Burridge *et Wennerberg.*, 2004). Au niveau structural, les protéines Rho sont composées de plusieurs domaines caractéristiques. Elles comprennent 5 sites de liaison au GTP et au GDP appelés « G box » ainsi que deux domaines impliqués dans l'interaction avec les régulateurs et les effecteurs des protéines Rho, appelés domaines Switch I et Switch II (Ihara K *et al.*, 1998). Les différences majeures de séquence d'acides aminés entre les diverses RhoGTPases se situent dans la

partie C-terminale appelée région hypervariable. Les RhoGTPases sont aussi sujettes aux modifications post-traductionnelles. Elles peuvent être prénylées sur la cystéine (C) de la séquence consensus CAAX (*Allal et al. 2000*). Ces modifications sont essentielles à leur ancrage à la membrane de la cellule, leur permettant ainsi d'être en contact avec leurs partenaires.

Les RhoGTPases, de par leur rôle dans l'organisation du cytosquelette, interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la contractilité, la migration et la prolifération cellulaire. RhoA est principalement connue pour son rôle dans la régulation de l'assemblage des filaments d'acto-myosine, ainsi que dans la formation des fibres de stress et des adhérences focales (*Ridley et Hall, 1992*). Autres que les régulateurs, de nombreux effecteurs des RhoGTPases et notamment de RhoA ont été identifiés (*Thumkeo et al, 2013*). Les plus décrits sont les sérine/thréonine kinases de la famille ROCK et la formine mDia. Les protéines ROCK au nombre de deux chez l'Homme sont impliquées dans l'assemblage et la contraction des fibres d'actine, ainsi que dans la formation des adhérences focales en aval de l'activation de RhoA (*O'Connor et al, 2013*). La protéine mDia, quant à elle, par sa coopération avec ROCK va participer à la formation des fibres de stress (*Watanabe et al, 1999*). De plus, elle possède également une activité de nucléation de l'actine et permet l'élongation des filaments d'actine. Elle peut également interagir avec la profiline, permettant ainsi l'ajout des monomères d'actine G au niveau de l'extrémité (+) des filaments d'actine. En aval de RhoA, mDia régule aussi la formation des microtubules (*Palazzo et al, 2001*). La protéine RhoA humaine possède donc une fonction clé dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine d'une part, *via* les protéines mDia et ROCK et du réseau de microtubules *via* mDia d'autre part.

Il a d'ailleurs été montré chez l'humain que l'enzyme HDAC8 semblait impliquée dans la modulation du cytosquelette et ce, par les différentes interactions mises en évidence avec certains composants du cytosquelette ou des voies de signalisation régulant ce mécanisme tels que l' α -actine (*Waltregny et al. 2005*), les chaînes lourdes de myosine (*Durst et al. 2003*) ou la cofiline (*Karolczak-Bayatti et al. 2011*). Cependant, aucune étude n'a encore suggéré qu'HDAC8 pourrait jouer un rôle dans la modulation du cytosquelette *via* une interaction directe avec une RhoGTPase et notamment avec RhoA. C'est pourquoi, il nous est apparu important d'envisager que chez *S. mansoni*, SmRho1 puisse être un nouveau partenaire ou substrat de SmHDAC8, suggérant ainsi que l'enzyme régulerait l'organisation du cytosquelette cellulaire *via* cette GTPase.

Dans cette étude, l'interaction entre SmRho1 et SmHDAC8 a tout d'abord été confirmée chez les vers adultes et chez les schistosomules. Des expériences réalisées en microscopie confocale ont également été entreprises afin de déterminer l'impact de l'inhibition de SmHDAC8 sur le cytosquelette d'actine chez le parasite. Grâce à l'utilisation d'un inhibiteur sélectif (le TH65 fourni par un partenaire du projet A-paraDDisE : Pr. W. Sippl, Université Halle-Wittenberg, Allemagne (*Kannan et al. 2014*)) nous avons mis en évidence une importante désorganisation du cytosquelette d'actine tégumentaire des vers adultes ainsi qu'une détérioration massive de l'actine musculaire chez les schistosomules. La relation entre SmHDAC8 et SmRho1 a soulevé également diverses questions, à savoir est-ce que SmRho1 est un substrat de SmHDAC8 ou un partenaire protéique ? L'étude de l'acétylation de SmRho1 a donc été réalisée et nous avons notamment pu démontrer par

spectrométrie de masse que la GTPase était acétylée sur la lysine 136.

Chez le parasite, deux isoformes de SmRho1 appelés SmRho1.1 et SmRho1.2 ont été identifiés et caractérisés. L'utilisation de système d'expression hétérologue tels que la technique du double hybride chez *Saccharomyces cerevisiae* et la co-immunoprécipitation en ovocytes de xénope, nous a permis de montrer que seule SmRho1.1 pouvait interagir avec SmHDAC8. De plus, la caractérisation des motifs d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1, par co-immunoprécipitation en ovocytes de xénope, suggère que le domaine C-terminal de SmRho1.1 serait impliqué dans cette interaction.

Matériels et Méthodes

Utilisation d'animaux – déclaration éthique.

Dans le cadre de cette étude, les expériences impliquant des hamsters ont été réalisées conformément à la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (STE n ° 123, Annexe A révisée), approuvés par le comité pour l'éthique en expérimentation animale de la région Nord Pas de Calais France (autorisation n ° AF / 2009) et de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille (Accord n ° A59-35009).

Matériel parasitaire

Afin d'obtenir les différents stades de la souche portoricaine de *Schistosoma mansoni* en laboratoire, les mollusques *Biomphalaria glabrata* et les hamsters dorés *Mesocricetus auratus* sont utilisés respectivement comme hôte intermédiaire et hôte définitif. Les vers adultes de *S. mansoni* sont obtenus par perfusion portale des hamsters, six semaines après l'infestation (Smithers et Terry, 1965). Les schistosomules sont obtenus *in vitro* par transformation mécanique de cercaires (Ramalho-Pinto et al. 1974).

Clonage des deux isoformes de SmRho1

L'ARN total des schistosomes adultes a été isolé en utilisant le kit de purification d'ARN RiboPure™. L'ADNc a été préparé en utilisant le kit GeneRacer™ avec la transcriptase inverse SuperScript™ III (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Les extrémités 5' et 3' de SmRho1.1 et SmRho1.2 ont été déterminées par PCR RACE en utilisant les amorces répertoriées dans le tableau 1 (RhoGTPase 5'1/5'2 et 3'1/3'2). Les produits amplifiés ont été sous-clonés dans le vecteur pCR™ 4-TOPO® et séquencés (Eurofins Genomics).

Les séquences des deux isoformes complètes ont ensuite été amplifiées en utilisant les amorces FLRho1 5' et 3', puis clonées dans un vecteur pCR™ 4-TOPO®. Une deuxième PCR a été réalisée en utilisant des amorces contenant respectivement les sites de restriction *NdeI* et *BamHI* et le fragment obtenu a été inséré dans un vecteur pCR™ 4-TOPO®.

Primers	Séquence 5'- 3'
RhoGTPase 5'1	CCGCGGAATGGATTGTCTTGT
RhoGTPase 5'2	TAAAGAAACACGCGGCCGATAGAAGTAG
RhoGTPase 3'1	TGGTGCATGCGGGAAACTT
RhoGTPase 3'2	GGGACACTGCTGGCCAAGAAGATT
FLRho1 5'	CTGGCGGTTCAGTTCGTGTGCT
FLRho1 3'	CCGCGGAATGGATTGTCTTGT
RhoNdeI 5'	TGGGCCGCACATATGGCGAGTGC
RhoBamHI 3'	GAGAACAGGGATCCTCAAATTAATCACACCTCC

Tableau 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour l'identification des séquences codantes pour SmRho1.1 et SmRho1.2.

Expression et purification des protéines recombinantes SmRho1.1 et SmRho1.2

Les séquences complètes de SmRho1.1 et SmRho1.2 ont été clonées entre les sites *NdeI* et *BamHI* du plasmide pNEA-tH qui code pour une étiquette poly-histidines en position N-terminale suivie d'un site de clivage par la thrombine. L'expression des deux protéines recombinantes SmRho1.1 et SmRho1.2 a été effectuée dans des bactéries *E. coli BL21 (DE3)*. L'expression des protéines est induite à 37°C en ajoutant une concentration finale de 500 mM d'Isopropyl-1-Thio-β-D-Galactopyranoside (IPTG, Euromedex). Les bactéries sont ensuite centrifugées et reprises dans un tampon de lyse (400 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8 et des antiprotéases : leupeptine 40 mM dilué au 1/2000^{ème}, Aprotinine 0.16 UI/mL dilué au 1/200^{ème} et fluorure de phénylméthylsulfonyl ou PMSF 200 mM dilué au 1/1000^{ème}) pour être fragmentées par sonication à 4°C pendant 15 minutes (puissance maximum, 32 cycles de 30s, Bioruptor® Plus, Diagenode). Ensuite, le lysat bactérien est centrifugé (17000 rpm) pendant 1h à 4°C puis pour finir, déposer sur une colonne d'affinité contenant une résine couplée au Nickel (Clontech) pré-équilibrée avec le tampon de lyse.

Production d'anticorps dirigés contre la protéine SmRho1.

Les anticorps polyclonaux dirigés contre SmRho1.1 ont été obtenus par injection sous-cutanée d'une solution contenant 50 µg de la protéine recombinante SmRho1.1 et un volume équivalent d'adjuvant d'Alun (Al(OH)₃) dans 3 souris BALB/c. Vingt et un jours et 35 jours après la première injection, une nouvelle injection est réalisée avec la même solution. Les souris sont sacrifiées 45 jours post-injection et le sérum est collecté. Le sérum des souris saines est récolté avant la première injection pour être utilisé comme témoin négatif.

Le sérum de souris immunisées est ensuite testé sur des extraits de couples de vers adultes et sur les protéines recombinantes SmRho1.1 et SmRho1.2 (*Figure 1A*).

Les extraits totaux des protéines des vers adultes de *S. mansoni* ont été obtenus après broyage des parasites dans un tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X100 1%, antiprotéases : leupeptine 40 mM dilué au 1/2000^{ème}, Aprotinine 0.16 UI/mL dilué au 1/200^{ème} et PMSF 200 mM dilué au 1/1000^{ème}). Leurs concentrations ont été déterminées en utilisant le kit Pierce® BCA Protein Assay selon les

RESULTATS

instructions du fabricant. Des protéines totales (25 µg) issues des parasites et 100 ng de protéines recombinantes ont été analysées par Western Blot en utilisant comme anticorps primaire les anticorps anti-SmRho1.1 (dilution 1/200^{ème}, 1/500^{ème}, 1/1000^{ème}) nouvellement produit et des anticorps secondaires dirigés contre les IgG de souris couplés à la peroxydase (dilution 1/50000^{ème}) (Figure 1A). Comme témoin positif, la protéine recombinante SmRho1.1 a été détectée à l'aide d'anticorps anti-6His (1/1000^{ème}, Sigma).

Bien que seule la protéine recombinante SmRho1.1 ait été utilisée pour produire les anticorps polyclonaux, ceux-ci sont capables de reconnaître SmRho1.1 et SmRho1.2 (Figure 1B). Ainsi il ne nous sera pas possible de discriminer les deux protéines natives présentes chez le parasite et nous parlerons donc d'anticorps anti-SmRho1 (Figure 1B). La protéine SmRho1 a également été détectée à tous les stades parasitaires (Figure 1C). Pour ce faire, 25 µg de protéines totales issues des différents stades parasitaires ont été analysées en Western blot dans les mêmes conditions que ci-dessus.

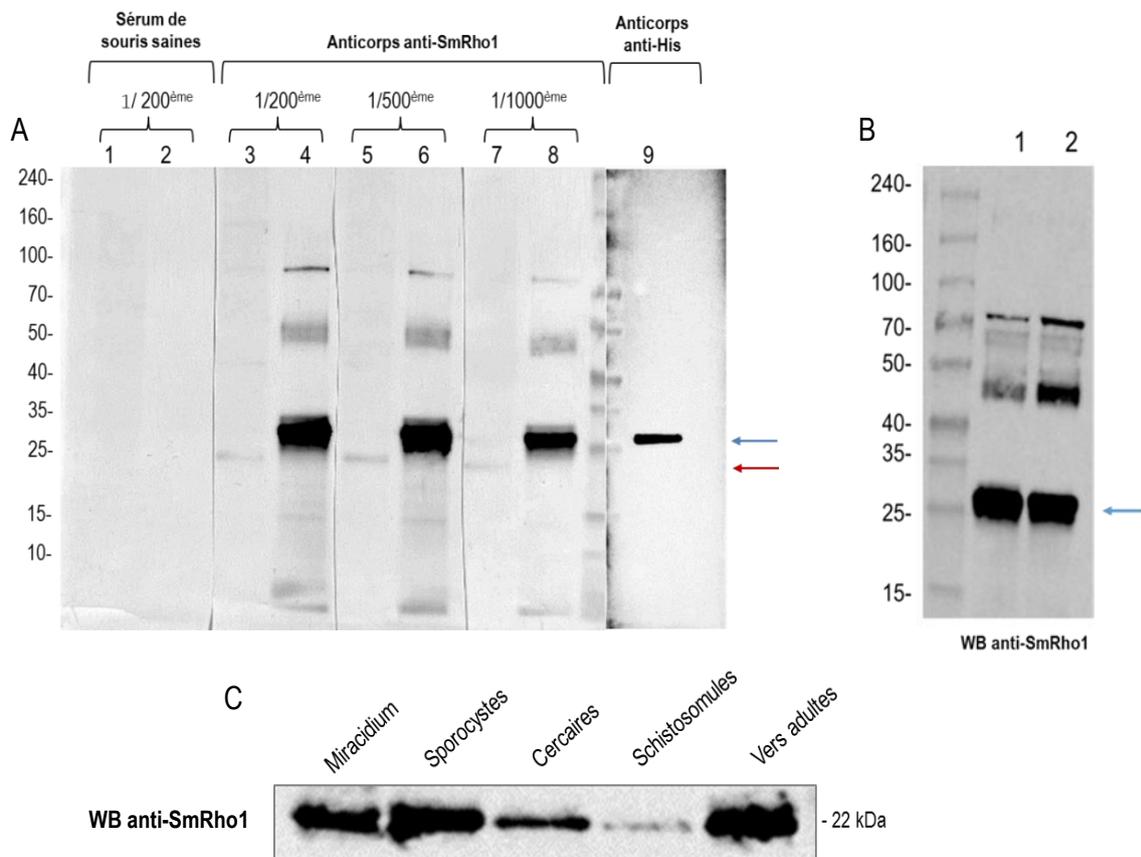


FIGURE 1 : Analyse en Western blot du sérum dirigé contre SmRho1.

(A) Détection de la protéine SmRho1 issues de couples de vers adultes (piste 1, 3, 5 et 7) et de la protéine recombinante SmRho1.1 (piste 2, 4, 6 et 8), à l'aide des anticorps anti-SmRho1. Comme témoin positif, la protéine recombinante SmRho1.1 a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-6His (piste 9). La flèche bleue indique la protéine recombinante SmRho1.1 et la flèche rouge la protéine native présente chez *S. mansoni*. (B) Vérification de la reconnaissance des protéines recombinantes SmRho1.1 (piste 1) et SmRho1.2 (piste 2) indiquées par la flèche bleue, par le sérum anti-SmRho1. (C) Détection de la protéine SmRho1 native exprimée dans les 5 stades parasitaire de *S. mansoni*, à l'aide des anticorps anti-SmRho1.

Immunoprécipitation (IP) et analyse par Western Blot, des protéines exprimées chez *S. mansoni* et des protéines recombinantes.

Les expériences d'IP réalisées chez les couples de vers adultes et les schistosomules ont été effectuées à l'aide

RESULTATS

des anticorps polyclonaux anti-SmRho1 de souris et anti-SmHDAC8 de souris à l'aide du kit Pierce™ Crosslink IP Kit (Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant (Caby *et al.* 2017). Brièvement, les vers adultes (100 couples) et les schistosomules (10000 parasites) ont été broyés dans du tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X100 1%, antiprotéases : leupeptine 40 mM diluée au 1/2000^{ème}, Aprotinine 0.16 UI/mL dilué au 1/200^{ème} et PMSF 200 mM dilué au 1/1000^{ème}) puis soumis à la sonication à 4°C pendant 30s (puissance maximum, 12 cycles, Bioruptor® Plus, Diagenode). Les échantillons parasitaires sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 10000g à 4°C. En parallèle, 10 µl d'anticorps ont été fixés sur des billes de protéine L-agarose (5 mg par IP, Thermo Scientific). Les surnageants issus des extraits protéiques parasitaires sont ajoutés et les échantillons sont incubés une nuit à 4°C. Comme témoin négatif d'IP, du sérum de souris saines est utilisé. L'analyse de l'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1 est réalisée à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-SmRho1 de souris (1/100^{ème}) et anti-SmHDAC8 de souris (1/100^{ème}) par Western Blot.

Les expériences d'IP réalisées avec les protéines recombinantes SmRho1.1, SmRho1.2 et SmHDAC8 ont été effectuées à l'aide des anticorps polyclonaux anti-SmRho1 de souris et anti-SmHDAC8 de souris à l'aide du kit Pierce™ Crosslink IP Kit (Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant et dans les mêmes conditions que ci-dessus. Cinq cents ng de protéines recombinantes ont été utilisées par IP et 50ng de protéines recombinantes seules ont été utilisé comme témoins positifs. Des IP réalisées avec du sérum de souris saines ont également été utilisées comme témoins négatifs.

Etude de l'acétylation de SmRho1 chez *S. mansoni*.

La mise en évidence de la présence et de l'acétylation des deux isoformes de SmRho1 chez le parasite a été réalisée par spectrométrie de masse après l'immunoprécipitation des protéines natives. Les anticorps, ne nous permettant pas de discriminer les deux isoformes, l'IP de SmRho1 a été réalisée à l'aide des anticorps anti-SmRho1 de souris (10 µl), de protéine L-agarose (5 mg par IP, Thermo Scientific) et du kit Pierce™ Crosslink IP Kit (Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant et comme décrit précédemment.

La totalité de l'éluât a été utilisée pour l'analyse en spectrométrie de masse et une IP réalisée avec du sérum de souris saines a été utilisée comme témoin négatif et analysée également en spectrométrie de masse (voir ci-dessous).

Analyse protéomique par spectrométrie de masse.

Les échantillons de protéines ont été dénaturés à 100 °C dans du SDS à 5%, β-mercaptoethanol à 5%, EDTA 1 mM, glycerol à 10% et tampon Tris pH 8 à 10 mM pendant 3 min, puis fractionnés sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE à 10%. La migration électrophorétique a été arrêtée lorsque l'échantillon de protéine a pénétré de 1 cm dans le gel de séparation. Le gel a été marqué brièvement avec du bleu de Coomassie et cinq bandes, contenant l'échantillon entier, ont été découpées. La digestion des protéines contenues dans les bandes de gel a été réalisée comme décrit précédemment. La séparation des produits de digestion des protéines a été effectuée en utilisant un système UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été automatiquement

RESULTATS

fractionnés sur une colonne commerciale à phase inversée C18 (75 µm x 150 mm, particule de 2 µm, colonne PepMap100 RSLC, Thermo Fisher Scientific, température 35° C). Le piégeage a été effectué pendant 4 min à 5 µl / min, avec du solvant A (98% de H₂O, 2% d'ACN (acétonitrile) et 0,1% de FA (acide formique)). L'élution a été effectuée en utilisant deux solvants A (0,1% de FA dans l'eau) et B (0,1% de FA dans l'ACN) à un débit de 300 nL / min. La séparation en gradient était de 3 minutes à 5% de B, de 37 minutes de 5% de B à 30% de B, de 5 minutes à 80% de B et maintenue pendant 5 minutes. La colonne a été équilibrée pendant 10 minutes avec 5% de tampon B avant l'analyse de l'échantillon suivant. Les peptides élués de la colonne C18 ont été analysés par le spectromètre Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) en utilisant un voltage de 1,9 kV et une température capillaire de 275 °C. Des balayages MS complets ont été acquis dans l'analyseur de masse Orbitrap sur la plage m/z 300-1200 avec une résolution de 35 000 (m / z 200) et une valeur cible de 5,00E +05. Les dix pics les plus intenses avec un état de charge entre 2 et 4 ont été fragmentés dans la cellule de collision HCD avec une énergie de collision normalisée de 27% et les spectres de masse en tandem ont été acquis dans l'analyseur de masse Orbitrap avec une résolution de 17 500 de 1.00E + 05. Le seuil de sélection des ions était de 5,0E + 04 comptes, et les temps d'accumulation d'ions maximum autorisés étaient de 250 ms pour les scans MS complets et de 100 ms pour les spectres de masse en tandem. L'exclusion dynamique a été définie sur 30 s.

Analyse de données protéomiques IP / MS.

Les données brutes collectées lors des analyses nanoLC-MS / MS ont été traitées et converties en format *.mgf avec ProteomeDiscoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Les données MS / MS ont été interprétées à l'aide du moteur de recherche Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, Londres, Royaume-Uni) installé sur un serveur local. Les recherches ont été effectuées avec une tolérance sur la mesure de masse de 0,2 Da pour le précurseur et de 0,2 Da pour les fragments d'ions, contre une base de données composite (25,970 entrées totales) construite avec la base de données *S. mansoni* Uniprot (identifiant de taxonomie 6183, 12 861 entrées), la trypsine recombinante et une liste de contaminants classiques (124 entrées). Pour chaque échantillon, les peptides ont été filtrés en fonction du seuil de détection des protéines avec un ou plusieurs peptides de plus de neuf résidus, un score ionique > 30, un score d'identité > 6, conduisant à un taux de faux positifs de 0,8%.

Analyse phénotypique par microscopie confocale à balayage laser

Les vers adultes (10 couples) ont été traités pendant 16h au TH65 (50 µM) et à la TSA (5 µM). De même, les schistosomules (2000 parasites) ont été traités pendant 16h au TH65 (10 µM) et à la TSA (3 µM). Des parasites traités avec du DMSO ont été utilisés comme témoin négatifs. Après traitement, les parasites ont été fixés dans une solution de PFA (paraformaldéhyde) 8% réalisée en tampon CB (« cytoskeletal buffer » : Hepes 10mM, NaCl 150 mM, EGTA 5 mM, glucose 5 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 6,1), pendant une heure à température ambiante (Scheffler *et al.* Huber 2014). Les parasites fixés sont ensuite incubés avec ce même tampon contenant 0,05% de saponine, du NH₄Cl (50 mM) et la phalloïdine (Alexa Fluor 488, Thermo Fischer Scientific, au 1/1000^{ème}) permettant le marquage des filaments d'actine, à température ambiante, pendant une nuit. Trois lavages ont ensuite été effectués en tampon CB. Le DAPI (1/1000^{ème}, Thermo Fischer Scientific) est ajouté au cours du

troisième lavage et incubé pendant 10 min à température ambiante. Les parasites sont enfin montés entre lames et lamelles dans du Mowiol (Calbiochem) puis observés en microscopie confocale à balayage laser (ZEISS LSM 880 avec Airyscan).

Analyses phylogénétiques et modélisation

L'analyse phylogénétique des RhoGTPases eucaryotes a été réalisée en utilisant les séquences protéiques provenant de vertébrés, plathelminthes (nématodes, cestodes, turbellariés), insectes, mollusques et levures. Les numéros d'accèsion des différentes séquences sont indiqués sur la *Figure 5C*. Les séquences ont été alignées à l'aide du programme BioEdit en utilisant la méthode ClustalW (*Thompson et al. 1994*).

L'arbre phylogénétique a été généré par le logiciel MEGA6.06 sous le modèle JTT + I + G avec 1000 bootstraps (*Tamura et al. 2013*) et la méthode du maximum de vraisemblance.

La modélisation des deux isoformes de SmRho1 a été effectuée à l'aide du serveur I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Les domaines caractéristiques des RhoGTPases ainsi que les résidus différents entre SmRho1.1 et SmRho1.2 ont été mise en évidence grâce au logiciel PYMOL (*Liang et al. 2003*).

Mise en évidence des interactions protéine/protéine par la technique du double hybride en levure

Les ADNc de SmRho1 (SmRho1.1, SmRho1.2, mutants SmRho1.1 E33K, SmRho1.2 K33E, 1-88 acides aminés (aa) et 1-143 aa), et SmHDAC8 ont été clonés dans les vecteurs pGADT7 et le pGBKT7 en amont de séquences qui codent respectivement pour une étiquette HA (acides aminés 98-106 de l'hémagglutinine du virus de l'influenza), et Myc, dérivé de l'oncogène c-myc. Le vecteur pGBKT7 contient la séquence nucléotidique codant pour le domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 (GAL4 DBD). De même, le vecteur pGADT7 contient la séquence codante pour le domaine d'activation de GAL4 (GAL4 AD). Les levures ayant été transformées avec les pGBKT7 et pGADT7 vont donc produire les protéines d'intérêts fusionnées au GAL DBD ou au GAL4 AD. L'interaction entre les protéines d'intérêts va permettre l'activation de la transcription des gènes rapporteurs *ade2* et *his3* que contiennent les souches AH109 et Y187 de *S. cerevisiae*. De ce fait, les levures vont synthétiser l'histidine et l'adénine et vont pouvoir croître en milieu sélectifs « *Triple Drop Out* » (TDO) : SD -leucine -tryptophane -histidine, ou sur un milieu de sélection plus stringant « *Quadruple DropOut* » Out (QDO) dépourvu de leucine, tryptophane, histidine et d'adénine.

Mutagenèse dirigée

Le mutant SmRho1.1 E33K a été obtenu par mutagenèse dirigée en substituant le codon du résidu acide glutamique en position 33 par celui du résidu lysine. De même, le mutant SmRho1.2 K33E a été obtenu par mutagenèse dirigée en substituant le codon de la lysine en position 33, par celui codant pour le résidu acide glutamique. Les fragments SmRho1. 1-88 aa et SmRho1. 1-143 aa ont été obtenus par insertion de codon stop prématuré. Les mutations ont été effectuées à partir du construit et des amorces, répertoriées dans le tableau 2, à l'aide de la *Taq* polymérase Isis (MP biomedical) selon les recommandations du fournisseur. Les produits de

RESULTATS

PCR ont été traités avec l'enzyme *DpnI* (Life Technologies, 1U) pendant 1 heure à 37°C. Les vecteurs contenant la séquence mutée ont été amplifiés dans des bactéries compétentes DH5 α (Invitrogen) puis séquencés (Eurofins Genomics).

Construits utilisés	Primers	Séquence 5'- 3'
SmRho1.1	SmRho1.1 E33K 5'	CAGCAAAGACCAGTTTCCC AAA GTTTACGTTCCCTACTGTATTGG
	SmRho1.1 E33K 3'	CGAATACAGTAGGAACGTAAAC TTT GGGAAACTGGTCTTTGCTG
	SmRho1. 1-88 aa 5'	GTTCTGTTATGTTATAGTATTGAT TG ACCCGATAGTTTTGCAAACATTGAGG
	SmRho1. 1-88 aa 3'	CCTCAATGTTTGCAAAACTATCGGG TCA ATCAACTATAACATAACAGAAC
	SmRho1. 1-143 aa 5'	CAACTTCCTGTCACTTTTAACT AG GGTAAACAAGTAGCTGAAAAG
	SmRho1. 1-143 aa 3'	CTTTTCAGCTACTTGTTTACC CTA GTAAAAGTGACAGGAAGTTG
SmRho1.2	SmRho1.2 K33E 5'	GTATTCAGCAAAGACCAGTTTCCC GAG GTATACGTTCCCTACTGTATTGG
	SmRho1.2 K33E 3'	CGAATACAGTAGGAACGTATAC CTC GGGAAACTGGTCTTTGCTGAA

Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les différentes mutagenèses dirigées.

Les codons mutés sont en rouge.

Synthèse *in vitro* d'ARNc

Les ARNc de SmHDAC8, SmRho1 (SmRho1.1, SmRho1.2, mutants SmRho1.1 E33K, SmRho1.2 K33E, 1-88 aa et 1-143 aa) et SmDia-RDB ont été synthétisés à l'aide du kit T7 mMessage mMachine (Ambion, USA). Les construits SmHDAC8-pGBKT7, SmRho1-pGADT7 (SmRho1.1 et SmRho1.2) et SmDia-pGBKT7 ont été linéarisés en utilisant l'enzyme de restriction *NofI*. Les construits SmRho1.1 E33K-pGADT7, SmRho1.2 K33E-pGADT7, SmRho1.1-88 aa-pGADT7 et SmRho1.1-143 aa-pGADT7 ont été linéarisés en utilisant l'enzyme *HindIII*. Les ARNc ont été précipités par une solution de chlorure de lithium (2,5 M), lavés dans de l'éthanol 70% et repris dans 20 μ L d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC). Après quantification par spectrométrie, un gel d'agarose dénaturant a été réalisé afin de confirmer la taille et la qualité des ARNc synthétisés.

Expression en ovocytes de xénope

Les ovocytes de *X. laevis* sont prélevés chirurgicalement après anesthésie des xénopes femelles et placés dans un milieu ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, Hepes 5 mM, ajusté à pH 7,4) contenant de la pénicilline (50 μ g/mL), de la streptomycine (50 μ g/mL), du pyruvate de sodium (225 μ g/mL) et un inhibiteur de trypsine (30 μ g/mL). Les ovocytes de stade VI sont ensuite traités à la collagénase A (1 μ g/mL) pendant 1 h, puis les cellules folliculaires sont retirées manuellement. Les ovocytes défolliculés sont conservés dans du milieu ND96 à 19°C. Ensuite, 60 nL d'ARNc (1 mg/mL) sont injectés dans chaque ovocyte (20 ovocytes) au niveau équatorial, à l'aide d'un nano injecteur, puis les ovocytes sont incubés 18h à 19°C dans du milieu ND96. Afin de contrôler l'état physiologique des ovocytes, on vérifie que ces derniers subissent la *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD), observable par l'apparition d'une tâche blanche au pôle animal des ovocytes. La GVBD est induite naturellement en réponse à la progestérone (2 μ g/mL de ND96), et indique la maturation des ovocytes.

Co-immunoprécipitation (coIP) et analyse par Western Blot, des protéines exprimées en ovocytes de xénope

Après 18h d'expression, les ovocytes contenant les protéines SmHDAC8, SmRho1 (SmRho1.1, SmRho1.2, mutants SmRho1.1 E33K, SmRho1.2 K33E, 1-88 aa et 1-143 aa) et SmDia-RBD, sont broyés dans du tampon PY (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% aprotinine, 1 mM PMSF, 1 µMleupeptine, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycérophosphate) puis centrifugés à 10 000 g durant 15 min à 4°C. L'expérience de coIP est réalisée à l'aide d'anticorps anti-Myc (1/100^{ème}, Invitrogen) ou anti-HA (1/100^{ème}, Invitrogen) pendant 4h à 4°C. Des billes d'agarose couplées à la protéine A (5 mg par IP, GE Healthcare) sont ensuite ajoutées pendant 1 h à 4°C. Les complexes sont récupérés par centrifugation, lavés 3 fois dans du tampon puis repris dans du tampon de Laemmli 1X, chauffés à 100°C pendant 10-15 min puis déposés sur un gel SDS-PAGE 10%. L'analyse des complexes protéiques est réalisée par Western Blot en utilisant des anticorps anti-HA (1/10000^{ème}) ou anti-Myc (1/50000^{ème}) et le système de détection advanced ECL (GE Healthcare).

Résultats

Suite à la mise en évidence de l'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1 par criblage en double hybride chez la levure (*Résultats, Partie I*) celle-ci a été vérifiée par co-immunoprécipitation (coIP), à partir d'extraits protéiques de couples de vers adultes (*Figure 2A*) et de schistosomules (*Figure 2B*). Pour ce faire, une stratégie de production d'anticorps dirigés contre la GTPase SmRho1 (*Figure 1*) a été mise en place et nous a permis de montrer que l'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1 était bien présente chez le parasite (*Figure 2*).

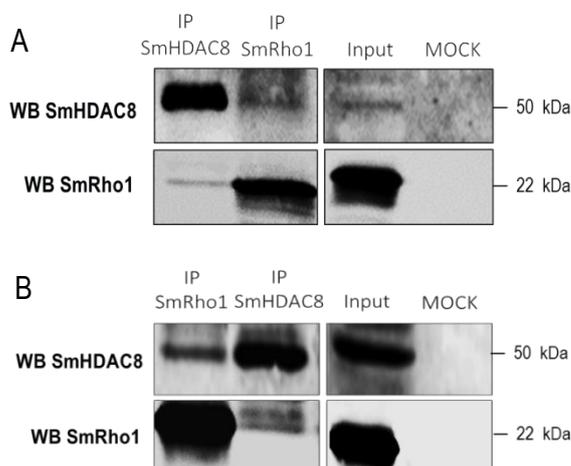


FIGURE 2 : Mise en évidence de l'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1, par coIP, chez S. mansoni.

Les protéines SmHDAC8 et SmRho1 ont été respectivement immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-SmHDAC8 et anti-SmRho1 de souris, fixés au préalable sur des protéines L- agarose, à partir d'extraits protéiques de vers adultes (A) et de schistosomules (B). Comme témoin, une IP a été réalisée avec du sérum sain de souris (MOCK). L'input correspond à l'extrait parasitaire total.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la relation existante entre SmHDAC8 et SmRho1, à savoir est-ce que ce sont des partenaires ou bien est ce que SmRho1 pourrait être un substrat de SmHDAC8 ? L'étude de l'acétylation de SmRho1, chez les schistosomules (*Figure 3C*) et les vers adultes (*Figure 3A et B*) a donc, dans un premier temps été entreprise. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que la protéine SmRho1 était acétylée sur la lysine 136. En effet, un increment de masse de 42 Da correspondant à la présence d'un groupement

acétylé est observé sur la lysine 136 du peptide TKQLPVTFNEGK de SmRho1, ce qui suggère que la RhoGTPase pourrait être un substrat potentiel de SmHDAC8 (Figure 3B).

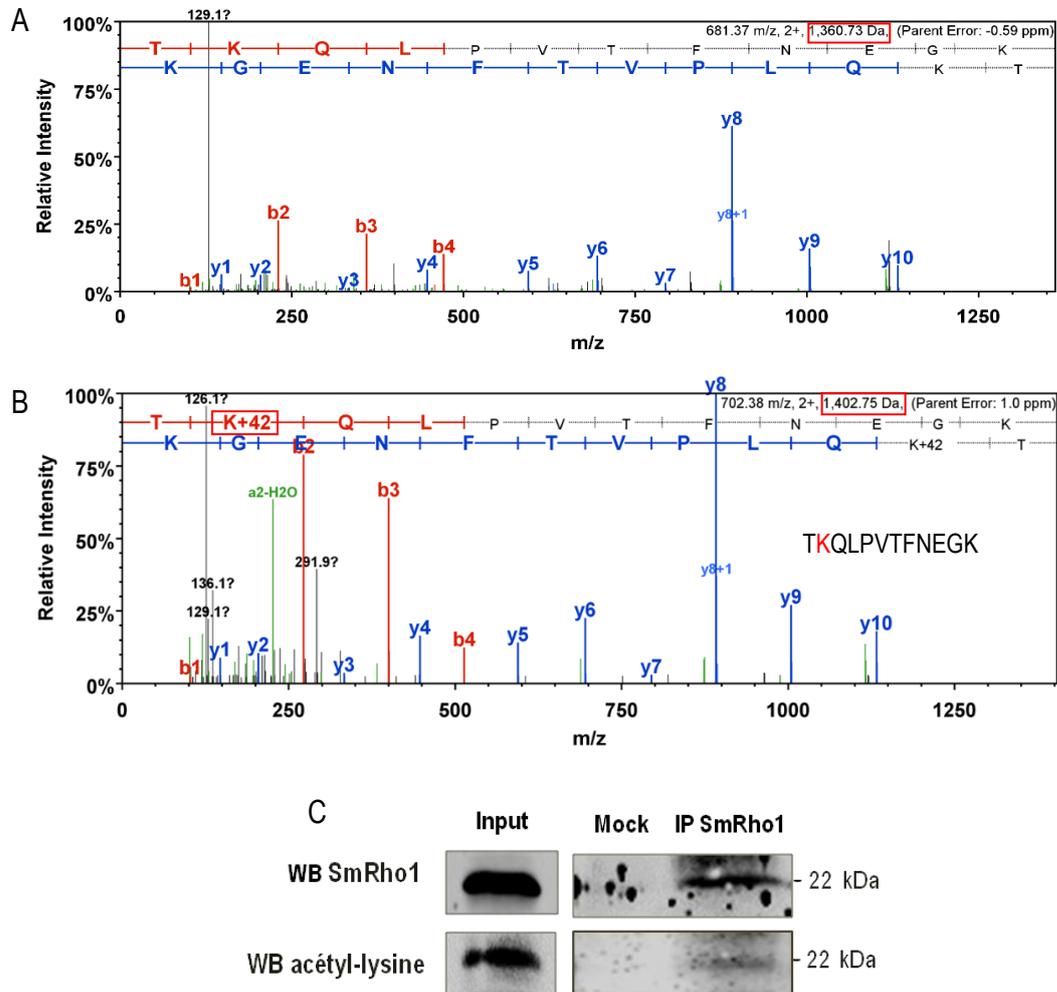


FIGURE 3 : SmRho1 est acétylée sur la lysine 136.

(A) Spectre MS/MS d'un peptide non acétylé (A) et acétylé (B) issue de la digestion trypsine du SmRho1(B). La lysine 136 acétylée est encadrée en rouge ainsi que les masses des peptides non acétylés (A) et acétylés (B). (C) La protéine SmRho1 issus d'extraits protéiques de schistosomules a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps dirigé contre SmRho1 puis détectée par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-SmRho1. Les protéines acétylées ont été détectées par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-acétyl-lysine. Une IP réalisée avec du sérum sain de souris a été utilisée comme témoin négatif (Mock).

Dans la suite de cette étude, nous avons réalisé des études en microscopie confocale afin d'identifier le rôle de SmHDAC8 dans la régulation du cytosquelette et de déterminer l'impact de son inhibition sur le réseau d'actine des cellules du parasite (Figure 4). Pour ce faire, des couples de vers adultes et des schistosomules ont été traités avec un inhibiteur sélectif de SmHDAC8, le TH65, puis marqués au DAPI et à la phalloïdine (Figure 4). Comme contrôle positif, des parasites traités avec de la TSA ont été utilisés. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence une désorganisation du réseau d'actine musculaire présent au niveau du tégument des vers adultes, après traitement des parasites au TH65 (Figure 4B). Chez les schistosomules, l'organisation de l'actine musculaire est également affectée de façon très marquée par l'inhibition de SmHDAC8 par le TH65 (Figure 4 H

et K). Par ailleurs, le traitement à la TSA semble aussi impacter la structure des filaments d'actine tégumentaire des parasites adultes (Figure 4C) bien que chez les schistosomules l'effet de l'inhibition par la TSA soit moins évidente (Figure 4 I et L).

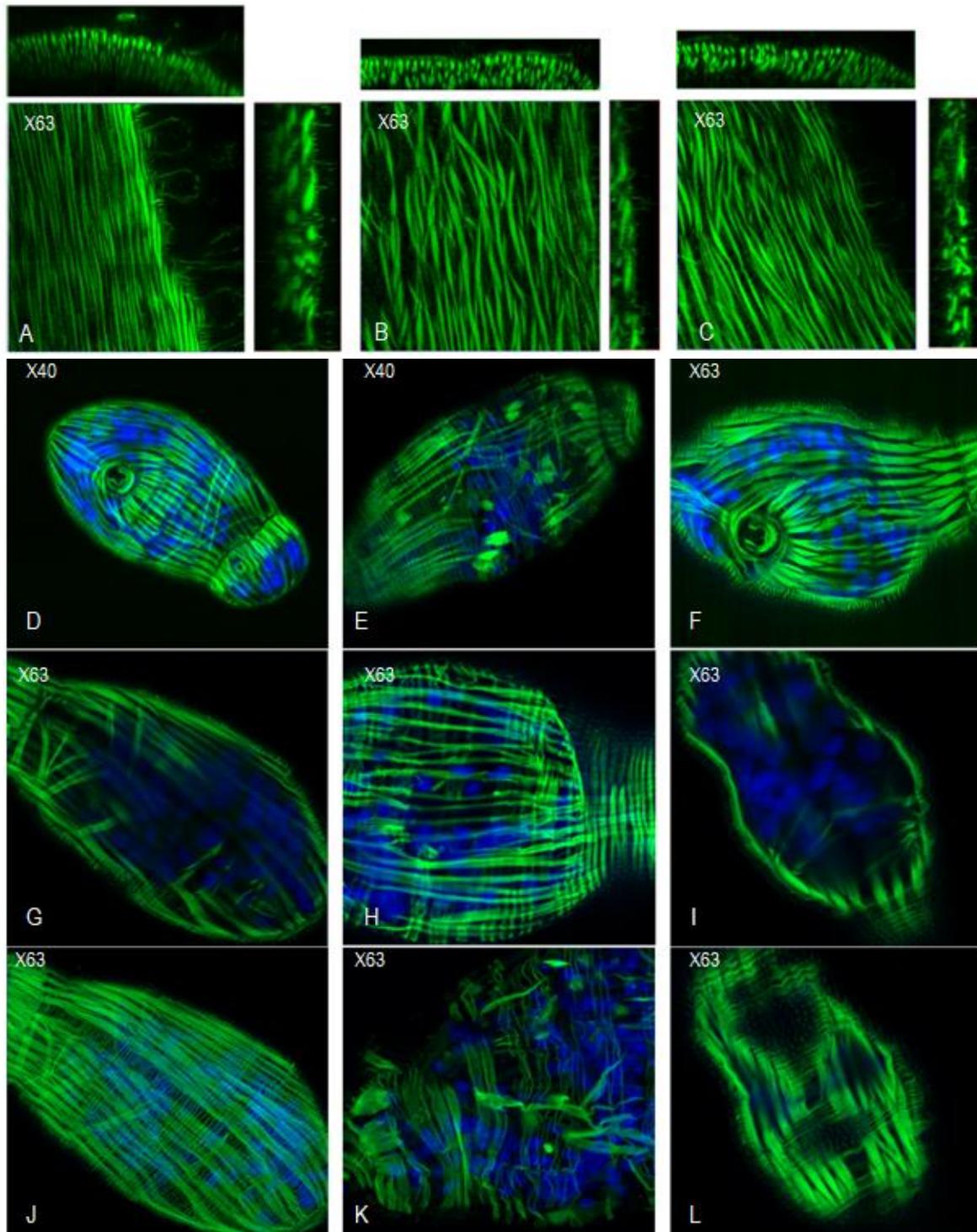


FIGURE 4 : Etude de l'effet de l'inhibition de SmHDAC8 sur le réseau d'actine des vers adultes (A à C) et des schistosomules (D à L), en microscopie confocale Airyscan.

Le réseau d'actine tégumentaire de vers mâles non traités (A) et traités au TH65 (B) ou à la TSA (C) a été marqué à la phalloïdine. En haut et à droite est représentée la visualisation de l'image dans les axes XZ et YZ, réalisée à l'aide du logiciel Zen. L'actine musculaire des schistosomules non traités (D, G et J), et traités au TH65 (E, H et K) ou à la TSA (F, I et L) a été marquée à la phalloïdine. Les noyaux ont également été marqués au DAPI.

➤ Identification et caractérisation des isoformes de SmRho1.

Chez *S. mansoni*, nous avons identifié par RT-PCR deux isoformes de SmRho1 que nous avons nommé SmRho1.1 et SmRho1.2. SmRho1.1 et 1.2 ne diffèrent que de sept acides aminés seulement et comme toutes les RhoGTPases (Figure 5B), elles sont organisées en plusieurs domaines (Figure 5B). Elles partagent respectivement avec HsRhoA, 72% et 73% d'identité. L'alignement des séquences de ces trois protéines a montré que les différents domaines caractéristiques des RhoGTPases sont parfaitement conservés à l'exception du domaine Switch I, où SmRho1.2 possède une lysine en position 33 à la place d'un acide glutamique (Figure 5B). Au niveau de la structure secondaire, les protéines SmRho1.1 et SmRho1.2 semblent similaires puisqu'elles sont constituées toutes deux, de six hélices α de deux hélices 3_{10} pour SmRho1.1 et une seule pour SmRho1.2 ainsi que six brins (B1 à B6) formant un feuillet β et dix boucles polypeptidiques. Toutefois, contrairement à RhoA, les deux hélices 3_{10} (H1 et H2) de l'orthologue humaine forme une seule hélice α chez les deux isoformes (Figure 5B).

La modélisation de la structure tridimensionnelle des deux isoformes de SmRho1 nous indique également que les 7 acides aminés qui diffèrent entre SmRho1.1 et SmRho1.2 sont situés à la surface des protéines et donc accessibles aux protéines partenaires des deux isoformes. L'importante variabilité en acides aminés au niveau de la région C-terminale pourrait expliquer la différence observée dans l'orientation du site de prénylation (Figure 5B). De plus, bien que les « G box » 2 à 5 possèdent une identité de séquence en acides aminés de 100%, la présence d'une lysine en position 33 chez SmRho1.2 à la place d'un acide glutamique chez SmRho1.1 semble induire une différence au niveau de la structure 3D du domaine G (en bleu sur la Figure 5B). Ces données suggèrent que les deux isoformes pourraient avoir des régulateurs et effecteurs différents. La Lysine 136 acétylée chez SmRho1.1 et SmRho1.2 semble également être un site de désacétylation potentiel et accessible pour SmHDAC8 (Figure 5B). Enfin, l'analyse phylogénétique des RhoGTPases que nous avons réalisé a permis de mettre en évidence un lien évolutif existant entre les deux isoformes de SmRho1 d'une part, et avec les autres RhoGTPases d'autre part. Il apparaît donc que SmRho1.1, SmRho1.2 et les différents membres de la sous-famille Rho (RhoA, B et C) se regroupent au sein d'un même cluster et que les deux isoformes de SmRho1 seraient issues d'un phénomène de duplication de gènes (bootstraps =100) (Figure 5C).

C

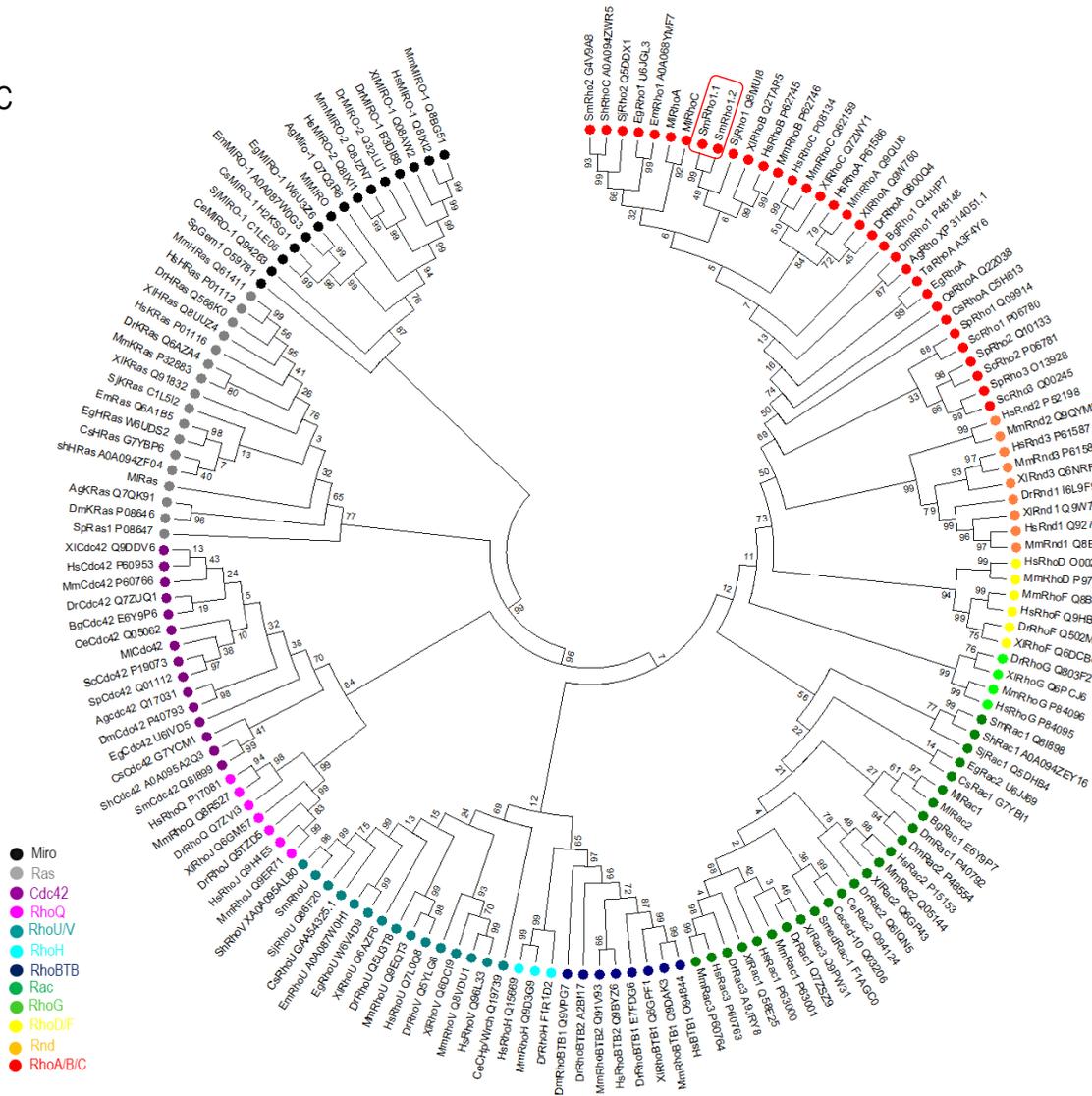


FIGURE 5 : Caractérisation des deux isoformes de SmRho1

(A) Analyse *in silico* de SmRho1.1 et SmRho1.2. Alignement des séquences des deux isoformes de SmRho1, SmRho2 (G4V9A8), SmRho3 (Q818A0) et de la GTPase RhoA humaine (P61586). Les résidus importants pour l'activité GTPasique sont indiqués par un trait bleu. Les domaines Switch I (encadré vert) et II (encadré jaune) sont impliqués dans la liaison aux effecteurs et régulateurs des RhoGTPases. La région C-terminale est composée d'un domaine hypervariable (encadré rouge) et d'une séquence consensus CAAX sujette aux modifications post-traductionnelles (violet : géranylgeranylé). Les points rouges représentent les mutations entre SmRho1.1 et SmRho1.2. (B) Modélisation des structures tridimensionnelles de SmRho1.1 et SmRho1.2. À droite les structures tertiaires de SmRho1.1 et SmRho1.2 sont représentées. À gauche, la surface des deux isoformes est représentée et les différents domaines caractéristiques ainsi que des résidus différents entre les deux GTPases sont indiqués sur la figure. (C) Analyse phylogénétique des GTPases de la famille Rho. Arbre phylogénétique des différentes sous-familles de Rho GTPases de vertébrés, plathelminthes (nématodes, cestodes, turbellariés), insectes, mollusques et levures généré par la méthode du maximum de vraisemblance (« *Maximum Likelihood* ») et celle du « bootstrap » (1000 répétitions). Les protéines Ras sont utilisées comme outgroup. SmRho1.1 et 1.2 sont encadrés en rouge.

La présence des deux protéines chez le parasite a été confirmée, par spectrométrie de masse (Figure 5A). La protéine SmRho1 a été immunoprécipitée à partir d'un extrait de couples de vers adultes. Une IP réalisée avec du sérum sain de souris a été utilisé comme témoin négatif. L'expérience a été réalisée en duplicat. Comme

attendu, nous avons démontré que les anticorps anti-SmRho1 de souris que nous avons produits ne discriminent pas les deux isoformes. Cette approche a également permis d'identifier les différents partenaires protéiques de SmRho1. Après l'IP de la RhoGTPase, plus de 1000 interactants potentiels ont été détectés pour chaque IP. Un degré significatif de variation entre les protéines identifiées dans les échantillons a été observé. En effet, les deux extraits protéiques parasitaires ont chacun été obtenus à partir d'un lot de vers adultes de *S. mansoni* des deux sexes. De plus, les variations de l'expression des protéines entre les deux lots de vers peuvent induire des différences entre les expériences. Il est également important de noter que *S. mansoni* est un parasite pluricellulaire complexe et que les quantités de protéines vont donc varier entre les différents types cellulaires au sein d'un même individu ainsi qu'entre eux. En tenant compte de cette variabilité relative entre chaque extrait protéique de parasites, les résultats obtenus pour les deux expériences ont été mise en commun et une sélection a été effectuée selon trois critères : (1) au moins 3 peptides dans l'IP SmRho1 (2) avec pas plus de 3 peptides dans l'IP témoin et (3) un ratio des spectres (spectres IP SmRho1/ spectres IP témoin) supérieur ou égal à 3.

A

Protein name	Protein molecular weight (Da)	Percentage sequence coverage		Peptide sequence		Total number unique peptide/spectra	
		IP-1	IP-2	IP-1	IP-2	IP-1	IP-2
SmRho1.1	21787	77%	81%	DQFPEVYVPTVFENYVADIEVDNR-EGVSDVFVAATR-HFcPDVPIVLVGNK-HFcPDVPIVLVGNK- ISAYAFFEcSAK -KLIVVGDGAcGK-LRPLSYDPTDVLVLLcYSIDSPDSFANIEEK-LVIVGDGAcGK-QLPVTFNEGK-QVELALWDTAGQEDYDR-TcLLIVFSK-TKEGVSDVFVAATR-TKQLPVTNEGK	DQFPEVYVPTVFENYVADIEVDNR-EGVSDVFVAATR-HDEATKNELHR-HFcPDVPIVLVGNK-HFcPDVPIVLVGNK- ISAYAFFEcSAK -KLIVVGDGAcGK-LRPLSYDPTDVLVLLcYSIDSPDSFANIEEK-LVIVGDGAcGK-QLPVTFNEGK-QVELALWDTAGQEDYDR-TcLLIVFSK-TKEGVSDVFVAATR-TKQLPVTNEGK	14/80	14/62
SmRho1.2	21858	59%	81%	EGVSDVFVAATR-HFcPDVPIVLVGNK-HFcPDVPIVLVGNK-KLIVVGDGAcGK-LVIVGDGAcGK-QLPVTFNEGK- QLPVTFNEGKEmAENINAYAFFEcSAK -QVELALWDTAGQEDYDR-TcLLIVFSK-TKEGVSDVFVAATR-TKQLPVTNEGK- VYVPTVFENYVADIEVDNR	EGVSDVFVAATR-EmAENINAYAFFEcSAK-HDEATKNELHR-HFcPDVPIVLVGNK-HFcPDVPIVLVGNK-KLIVVGDGAcGK-LRPLSYDPTDVLVLLcYSIDSPDSFENIPEK-LVIVGDGAcGK-QLPVTFNEGK- QLPVTFNEGKEmAENINAYAFFEcSAK -QVELALWDTAGQEDYDR-TcLLIVFSK-TKEGVSDVFVAATR-TKQLPVTNEGK- VYVPTVFENYVADIEVDNR	12/79	15/69

B

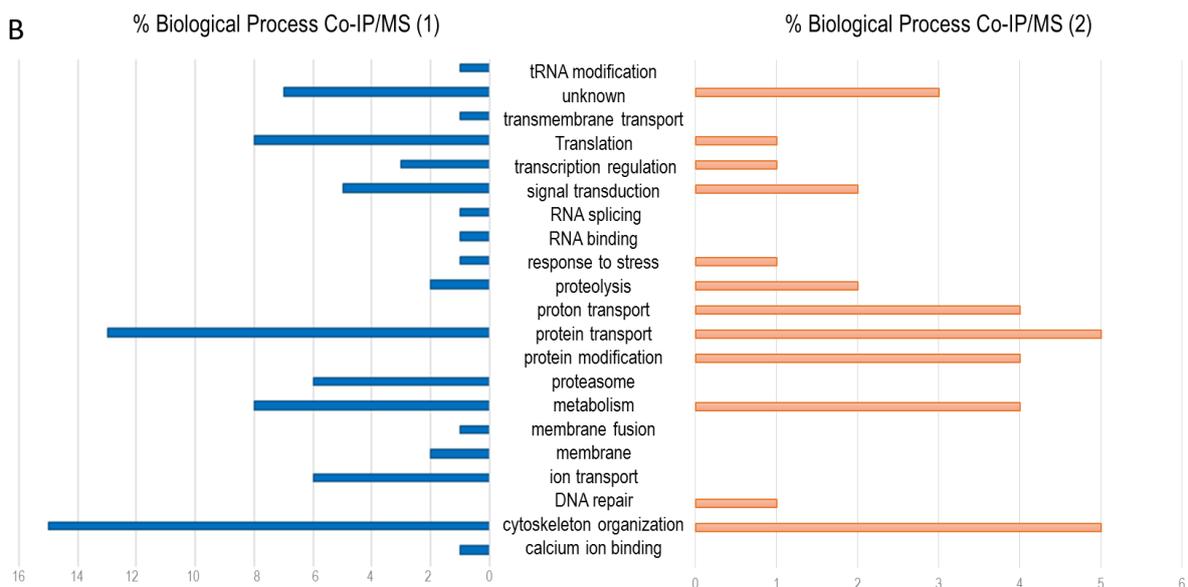


FIGURE 6 : Identification et caractérisation de l'interactome de SmRho1 par nanoLC-MS/MS.

(A) Tableau mettant en évidence la présence des deux isoformes de SmRho1 chez les vers adultes de *S. mansoni*. (B) Histogramme montrant les processus biologiques dans lesquels les partenaires protéiques de SmRho1 sont impliqués. Les processus ont été définis à l'aide du logiciel Blast2GO.

RESULTATS

Après sélection et selon les critères définis précédemment, 84 et 30 protéines respectivement pour les IP1 et 2 ont été retenues. Parmi les protéines identifiées deux sont communes aux deux IP : la cofiline et la RhoGTPase SmRho2 (*Figure 1 en annexe*). La cofiline, qui avec RhoA et ROCK1 forme un complexe protéique, est impliquée dans la stabilisation des filaments d'actine (*Amin et al, 2013*). En effet, après avoir été activée par RhoA (via sa fixation à son RBD-Rho Binding Domain), ROCK1 va activer la LIM kinase en la phosphorylant. Celle-ci va alors inhiber la cofiline en la phosphorylant. Bien que ROCK ne soit pas retrouvé dans l'interactome de SmRho1, il n'est donc pas étonnant de retrouver la cofiline comme l'un des membres du complexe protéique formé potentiellement par SmRho1, ROCK et la LIMK du parasite. L'identification de SmRho2 comme partenaire de SmRho1 est néanmoins plus surprenante (*Tableau 1 en annexe*). En effet, aucune étude n'a encore mis en évidence une interaction entre deux isoformes d'une même sous-famille chez les RhoGTPases. Ainsi l'interaction directe ou au sein d'un complexe protéique entre RhoA avec RhoB ou RhoC n'a jamais été décrite. Il est donc possible que la présence de SmRho2 dans l'interactome de SmRho1 s'explique par l'IP de cette isoforme par les anticorps anti-SmRho1, probablement du fait de l'importante homologie de séquence entre SmRho1 et SmRho2 (72%) chez le parasite (*Vermeire et al. 2003*). Il est également envisageable que les deux protéines (SmRho1 et SmRho2) pourraient se retrouver au sein d'un même complexe multiprotéique.

D'autres travaux ont cependant démontré que différentes RhoGTPases pouvait agir en collaboration dans la régulation de certains processus cellulaires. C'est le cas de RhoA et Cdc42 dont la coopération a été mise en évidence lors de la migration de fibroblastes embryonnaires de souris (*MacHacek et al. 2009*). Ainsi la présence de Cdc42 comme partenaire de SmRho1 chez le parasite est cohérente.

En résumé, SmRho1 serait impliquée dans environ 21 processus biologiques différents tels que la régulation de la transcription et de la traduction, la réparation de l'ADN, le métabolisme ou la réponse au stress (*Figure 6B*). De plus, au même titre que son orthologue humain RhoA, elle jouerait également un rôle dans l'organisation du cytosquelette, ou encore le transport vésiculaire. En effet, la clathrine et Rab15 ont aussi été identifiées comme partenaires de SmRho1 chez le parasite. Il a d'ailleurs été montré que RhoA était impliqué dans le processus d'endocytose médiée par la clathrine. Ainsi, en 2008, *Reiner et Nathanson* ont démontré que l'internalisation des récepteurs muscariniques M2 et M4 impliquait la RhoGTPase RhoA ainsi que la GTPase Rab15. Fait intéressant, la protéine RhoGDI, régulateur négatif de l'activité GTPasique des Rho, a aussi été identifiée comme partenaire de SmRho1 suggérant ainsi que les mécanismes de régulation des RhoGTPase sont conservés chez *S. mansoni*. En revanche, nous n'avons pas identifié SmHDAC8 dans l'interactome de SmRho1. Comme nous l'avons déjà vu précédemment, l'importante variabilité dans l'expression des protéines chez le parasite explique le fait que l'on ne retrouve parfois pas les interactants attendus. De plus, si SmRho1 est un substrat de SmHDAC8, il n'est pas étonnant de ne pas l'avoir détectée en spectrométrie de masse. De plus, il est important de souligner que nous n'avons pas identifié SmRho1 comme partenaire de SmHDAC8 par coIP/MS mais uniquement par la méthode du double hybride en levure. Ces mêmes raisons peuvent expliquer l'absence des protéines régulatrices GEFs et GAPs, bien que présentes dans l'interactome de la protéine humaine RhoA

réalisé par *Paul et al. (2017)*. Cette étude qui utilise des expériences de pull-down à partir d'extraits protéiques de cellules HeLa est donc difficilement comparable.

➤ Etude de l'interaction entre SmHDAC8 et les deux isoformes de SmRho1.

Dans l'impossibilité de discriminer les deux isoformes de SmRho1 chez le parasite avec les anticorps anti-SmRho1, l'étude de l'interaction entre SmHDAC8 et les deux isoformes de SmRho1, a été réalisée d'une part grâce aux protéines recombinantes afin de mettre en évidence une interaction directe, et d'autre part, par l'utilisation de systèmes cellulaires hétérologues : l'ovocyte de xénope et la levure.

Une première expérience de coIP a été réalisée à l'aide des différentes protéines recombinantes SmHDAC8, SmRho1.1 et SmRho1.2. Nous constatons ici que les deux protéines recombinantes SmRho1.1 et SmRho1.2 sont capables d'interagir avec SmHDAC8 (*Figure 7*) et que ces interactions sont donc directes.

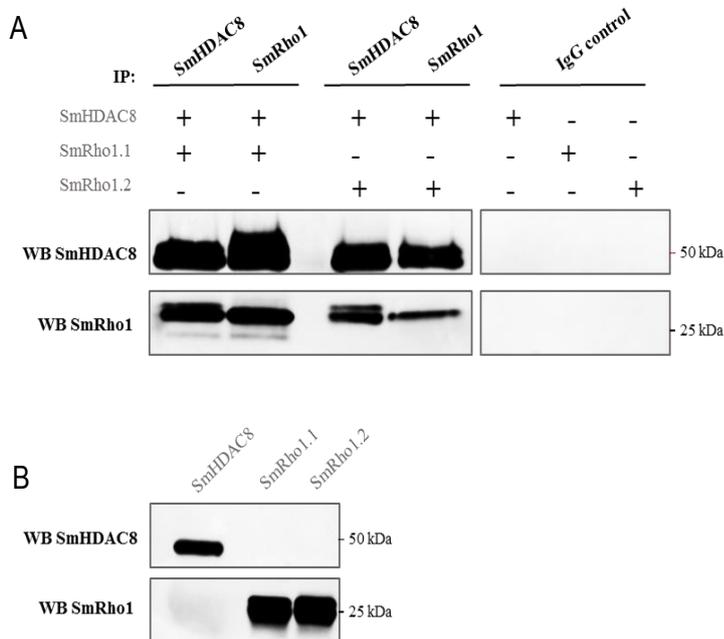


FIGURE 7 : Etude de l'interaction entre les protéines recombinantes SmHDAC8, SmRho1.1 et SmRho1.2 par coIP.

Les protéines recombinantes SmHDAC8, SmRho1.1 et SmRho1.2 ont été immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-SmHDAC8 et anti-SmRho1 de souris, fixées au préalable sur des protéines L-agarose (**A**). Les protéines recombinantes seules ont été utilisées comme témoin. Des IP témoins ont également été réalisées à l'aide de sérum de souris sain (**B**).

Néanmoins, dans le système d'expression utilisant des ovocytes de xénope, seule SmRho1.1 semble interagir avec la protéine SmHDAC8 (*Figure 8A*). De même, en levure, nous avons montré par la technique du double hybride que SmHDAC8 interagit avec SmRho1.1 et non avec l'isoforme SmRho1.2 (*Figure 8B*). Il y aurait donc une interaction spécifique entre SmHDAC8 et SmRho1.1. Rappelons néanmoins que les protéines recombinantes SmRho1.1 et SmRho1.2 sont toutes deux capables d'interagir avec SmHDAC8. Il semblerait donc que la spécificité d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1 soit dépendante du contexte cellulaire. Il est aussi possible qu'en système d'expression hétérologue les protéines subissent des modifications post-traductionnelles qui vont réguler leurs interactions ou leurs affinités avec certains partenaires. De même, un repliement incorrect des protéines recombinantes pourrait avoir un impact sur la liaison à SmHDAC8.

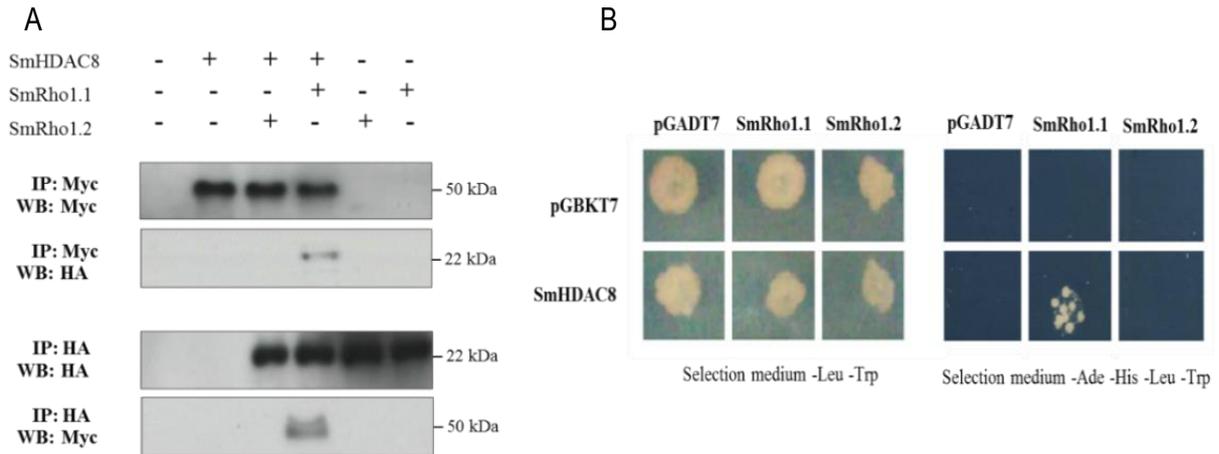


FIGURE 8 : Etude de l'interaction entre SmHDAC8 et les deux isoformes de SmRho1, par colP en ovocyte de xénope (A) et par la technique du double hybride chez *S. cerevisiae* (B).

(A) Les ARNc de SmHDAC8, SmRho1.1 et SmRho1.2 ont été micro-injectés en ovocytes xénope. Après 18h d'expression et lyse des ovocytes, SmHDAC8 fusionnée à une étiquette Myc a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-Myc. De même, SmRho1.1 et SmRho1.2, en fusion avec une étiquette HA, ont été immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps anti-HA. Les protéines ont ensuite été détectées par Western blot en effectuant des révélations croisées. (B) La sélection des diploïdes s'effectue sur milieu SD -leucine -tryptophane (SD -Leu, -Trp). Ces colonies ont par la suite été ensemencées sur un milieu restrictif (SD -Ade, -His, -Leu, -Trp) permettant de mettre en évidence l'interaction entre SmHDAC8 et les isoformes de SmRho1, par la technique du double hybride).

En nous basant sur la spécificité d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1 précédemment démontrée et dans le but de déterminer les motifs responsables de l'interaction entre ces deux protéines, différentes protéines mutantes de SmRho1 ont été produites par mutagenèse dirigée. L'alignement des séquences protéiques de SmRho1.1 et SmRho1.2 a montré qu'il existait seulement 7 acides aminés différents entre les deux isoformes. Ces mutations sont essentiellement situées dans la partie C-terminale de la protéine. Dans la partie N-terminale, seul l'acide glutamique en position 33 de SmRho1.1 est substitué par une glycine dans la séquence protéique de SmRho1.2. Deux fragments N-terminaux de tailles variables ont donc été produits, par insertion de codon stop prématuré, à partir de la protéine SmRho1.1 afin d'identifier le domaine de la protéine responsable de l'interaction avec SmHDAC8 (Figure 9A). En parallèle, deux autres protéines mutantes à partir de SmRho1.1 et SmRho1.2 ont été produites. Le codon de l'acide glutamique en position 33 de SmRho1.1 a donc été substitué par celui codant pour une lysine. De la même façon, le codon du résidu lysine de SmRho1.2 en position 33 a été substitué par celui codant pour l'acide glutamique (Figure 9A). L'utilisation des ovocytes de xénope comme système d'expression hétérologue nous a permis d'étudier l'interaction entre SmHDAC8 et les différents mutants de SmRho1. Les expériences de colP ont montré que le domaine C-terminal serait impliqué dans cette interaction (Figure 9B).

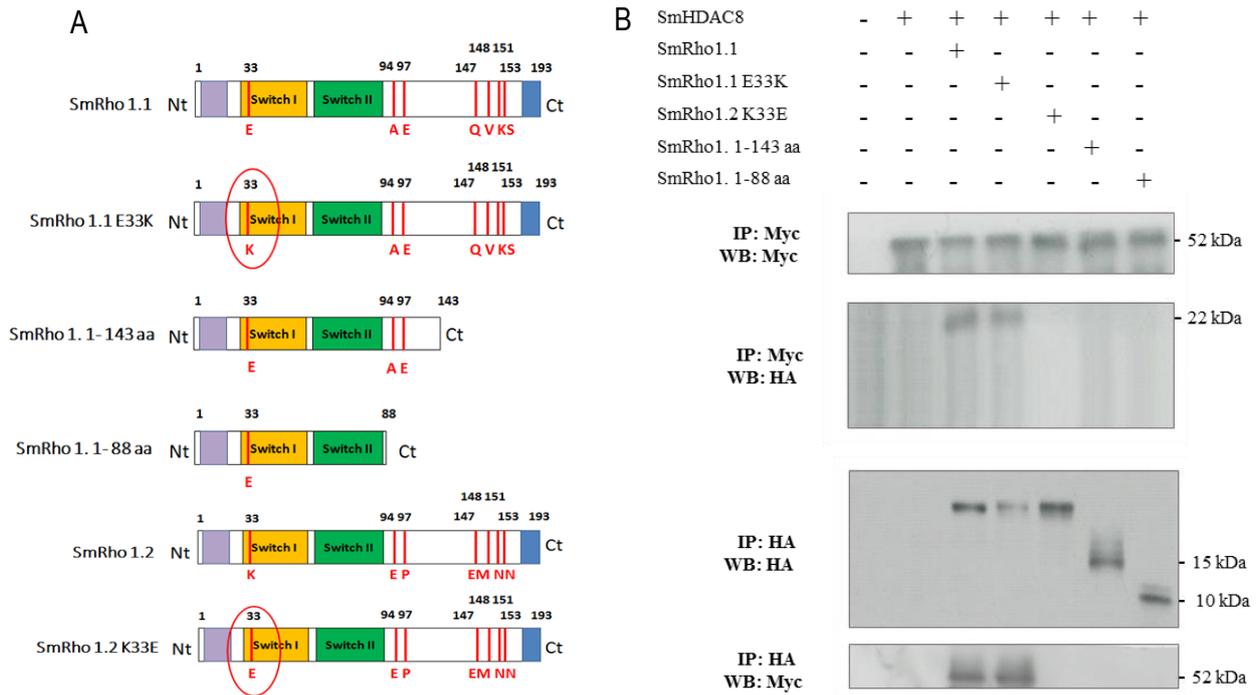


FIGURE 9 : Recherche des motifs de SmRho1 impliqués dans l'interaction avec SmHDAC8, par coIP en ovocytes de xénope.

(A) Représentation schématique des protéines mutantes de SmRho1, produites par mutagenèse dirigée. Les fragments SmRho1. 1-88 aa et SmRho1. 1-143 aa ont été produits par insertion d'un codon stop prématuré. La protéine SmRho1.1 E33K a été produite par substitution du codon de l'acide glutamique en position 33 par celui de la lysine, à partir de SmRho1.1. La protéine SmRho1.2 K33E a été produite par substitution du codon de la lysine en position 33 par celui de l'acide glutamique, à partir de SmRho1.2. (B) Les ARNc de SmHDAC8, SmRho1.1, SmRho1.1E33K, SmRho1.2 K33E, SmRho1. 1-88 aa et SmRho1. 1-143 aa, ont été injectés ou co-injectés en ovocytes de xénope. Après lyse des ovocytes, les protéines sont immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-Myc et anti-HA. Les protéines sont identifiées par Western blot en réalisant des révélations croisées à l'aide d'un anticorps anti-HA et anti-Myc.

Discussion

Afin de mieux caractériser les fonctions biologiques de SmHDAC8, nous avons identifié des protéines partenaires potentielles en criblant une banque d'ADNc par la technique du double hybride en levure et par spectrométrie de masse en réalisant un IP de la protéine native SmHDAC8 du parasite. Parmi les interactants identifiés, certains sont impliqués dans la modulation du cytosquelette (*Caby et al. 2017*). Notre identification de SmRho1 comme partenaire de SmHDAC8 et la mise en évidence de l'interaction entre ces deux protéines chez le parasite est cohérente avec le rôle postulé de cette dernière dans la modulation du réseau d'actine. De plus, les études réalisées en microscopie confocale sur les vers adultes mâles et les schistosomules soutiennent cette hypothèse puisque nous avons pu observer une désorganisation du cytosquelette d'actine après un traitement au TH65. Toutefois, aucun phénotype n'a été observé chez les vers adultes femelles. Par ailleurs, chez les schistosomules, l'inhibition de SmHDAC8 semble induire des phénotypes d'intensités différentes puisque le réseau d'actine musculaire de certains individus semble plus ou moins affecté. Ces expériences devront donc être réitérées afin de confirmer les phénotypes obtenus. Nous pourrions également réaliser ces investigations après l'interférence du transcrit de SmHDAC8 par ARNi.

RESULTATS

Nous avons également montré qu'il existe deux isoformes de SmRho1 (SmRho1.1 et SmRho1.2). La caractérisation de ces deux protéines a démontré que les différents domaines caractéristiques des RhoGTPase étaient très conservés avec la protéine humaine. De plus, comme l'on pouvait s'y attendre, l'interactome de SmRho1 a mis en évidence différents partenaires impliqués dans la régulation de l'organisation du cytosquelette. Bien que les GEFs, GAPs et les protéines mDia et ROCK n'aient pas été retrouvées, certaines protéines telles que la cofiline par exemple ont attiré notre attention puisqu'elles forment des complexes protéiques avec les différents effecteurs et régulateurs des protéines Rho chez l'Homme. De plus, il est possible que certains partenaires des RhoGTPases soient présents en faibles quantités dans l'extrait parasitaire pour être détectés. Il serait donc intéressant d'utiliser une approche complémentaire, nous permettant d'identifier les partenaires directes de SmRho1 telle que la technique du double hybride chez la levure.

La spécificité d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1 nous a apporté un indice supplémentaire quant à la complexité de la voie de signalisation impliquant ces protéines. Ce résultat peut pourtant être discuté puisqu'il a été obtenu par l'utilisation de système d'expression hétérologue et que l'étude de l'interaction directe entre SmHDAC8 et les deux isoformes de SmRho1.1 à l'aide des différentes protéines recombinantes n'a fait que contredire cette observation. Il apparaît donc nécessaire de mettre en évidence cette spécificité d'interaction chez le parasite. En effet, après IP de SmHDAC8 issue de couples de vers adultes et/ou de schistosomules, la protéine SmRho1 pourrait être analysée en spectrométrie de masse afin d'identifier l'isoforme présente. Néanmoins, des différences de séquences entre les domaines C-terminaux des deux isoformes pourraient expliquer une spécificité d'interaction.

La caractérisation des motifs d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1 a montré que l'acide glutamique en position 33 de SmRho1.1 n'était pas impliqué. Il semblerait toutefois que ce soit le domaine C-terminal qui en est responsable. Cependant, il est important de noter que cette observation est déduite de l'étude de la liaison entre SmHDAC8 et des fragments de SmRho1.1 que nous avons produits par insertion d'un codon stop prématuré. Ainsi, il est possible que les fragments ne soient plus capables d'interagir avec SmHDAC8 car la structure de SmRho1 a été par conséquent affectée. Nous proposons donc d'effectuer des mutations ponctuelles dans la séquence de SmRho1.1 et de SmRho1.2 afin de vérifier l'importance des résidus qui diffèrent entre ces deux dernières et déterminer leurs influences sur cette interaction (voir la Discussion générale).

En nous questionnant sur la spécificité d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1, il nous ait apparu évident que chaque isoforme pourrait avoir des partenaires qui leurs sont propres. Ainsi l'interaction entre les deux isoformes de SmRho1 et le « Rho Binding Domain » de SmDia (SmDia-RBD) a donc été étudiée en ovocyte de xénope et chez la levure. De manière surprenante, les résultats obtenus ont montré que seule SmRho1.2, l'isoforme qui ne semble pas se lier à SmHDAC8, interagissait spécifiquement avec SmDia-RBD (Rho Binding Domain). Ce qui suggère que la voie qui régule l'organisation du cytosquelette chez le parasite serait plus complexe que celle de l'homme (*Figure 10*).

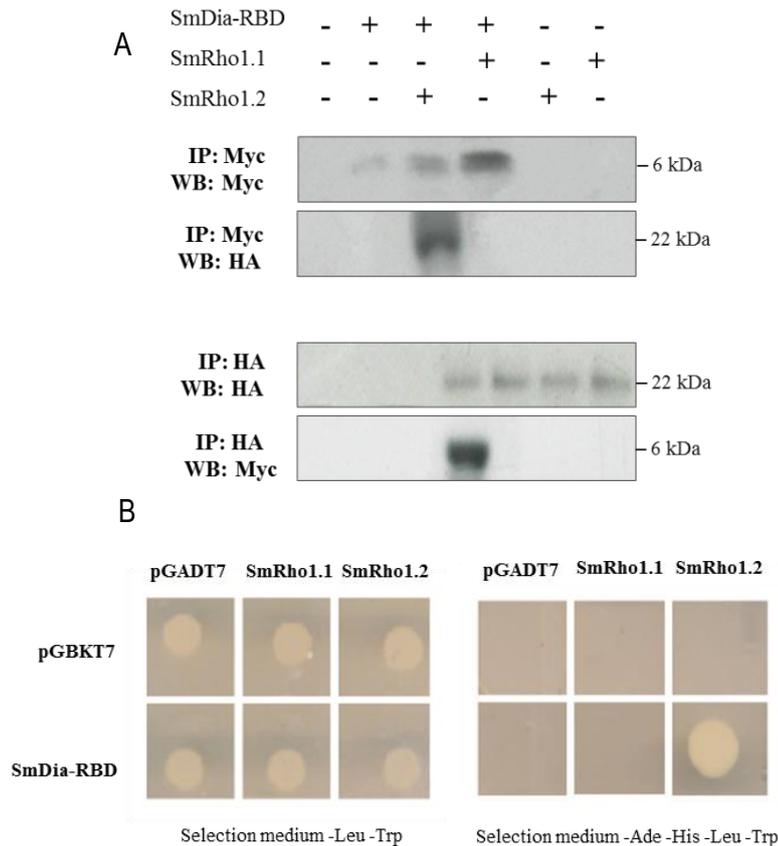


FIGURE 10 : Mise en évidence de l'interaction spécifique entre SmRho1.2 et SmDia-RBD.

(A) Les ARNc du Rho binding domain (RBD) de SmDia, SmRho1.1 et SmRho1.2 ont été micro-injectés en ovocytes de xénope. Après 18h d'expression et lyse des ovocytes, SmDia-RBD fusionnée à une étiquette Myc a été immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-Myc. De même, SmRho1.1 et SmRho1.2, en fusion avec une étiquette HA, ont été immunoprécipitées à l'aide d'un anticorps anti-HA. Les protéines ont ensuite été détectées par Western blot en effectuant des révélations croisées. (B) Le croisement entre les souches AH109 et Y187 contenant respectivement les ADNc de SmRho1.1 et SmRho1.2 en pGADT7, et SmDia-RBD en pGBKT7 a été réalisé afin d'obtenir des levures diploïdes. La sélection des diploïdes s'effectue sur milieu SD -leucine -tryptophane (SD -Leu, -Trp). Ces colonies ont par la suite été ensemencées sur un milieu restrictif (SD -Ade, -His, -Leu, -Trp) permettant de mettre en évidence l'interaction entre SmHDAC8 et les isoformes de SmRho1, par la technique du double hybride.

De par les nombreux substrats qu'elle possède, la protéine HDAC8 humaine détient, au sein de la cellule, de multiples rôles. En effet, des protéines comme le récepteur à l'œstrogène ERR α , le facteur de transcription CREB, la protéine SMC3 ou encore la protéine p53 ont été répertoriés comme substrats d'HDAC8 (Wolfson *et al*, 2013). Elle semble donc être impliquée dans des processus essentiels à la cellule, tels que la mitose, la régulation de la transcription des gènes ou encore le remodelage de la chromatine. Un autre rôle attribué à la protéine HDAC8 est son implication dans l'organisation du cytosquelette. En effet, il a été montré que HDAC8 pouvait interagir d'une part avec l' α -actine et d'autre part avec les chaînes lourdes de myosine et la cofiline (Wolfson *et al*, 2013). De plus, la diminution de la capacité des cellules musculaires à se contracter observé après leur traitement avec des siARN dirigés contre HDAC8 (Waltregny *et al*. 2005), suggèrent que cette dernière participe au complexe protéique modulant le cytosquelette. C'est pourquoi, il nous ait apparu important d'envisager que SmRho1 puisse être un substrat de SmHDAC8 et qu'elle soit acétylée. Cependant, des études ont montré que la

RESULTATS

protéine RhoA n'était pas présente dans l'acétylome humain (*Choudhary et al, 2009*) ou de la drosophile (*Weinert et al. 2011*), et non répertoriée comme substrat de HDAC8 (*Olson et al, 2014*). Bien que la caractérisation de l'acétylome humain ait été effectuée sur trois lignées cellulaires différentes, il est possible qu'avec les techniques utilisées, la protéine RhoA n'ait pas pu être détectée. Quant aux travaux d'*Olson et al (2014)*, ils n'ont pas permis d'identifier la protéine p53, connue pour être un substrat de HDAC8. Pourtant, en 2016, *Hong et al*, en réalisant l'acétylome global de *S. japonicum* ont mis en évidence l'acétylation de la protéine SjRho1 acétylée sur la lysine 141. De nombreuses études ont aussi montrées que l'activité GTPase de RhoA était dépendante des modifications post-traductionnelles qu'elle peut subir. La phosphorylation de RhoA par exemple par la PKA, va réguler négativement l'activation de ROCK sans avoir d'impact sur son autre effecteur, la protéine mDia (*Nusser et al. 2006*). Il n'était donc pas surprenant que la protéine SmRho1 soit de même acétylée chez *S. mansoni* (*Figure 3*). L'utilisation d'inhibiteur de SmHDAC8 sera alors nécessaire afin de déterminer si SmRho1 est un substrat de SmHDAC8.

Pour conclure, les données obtenues à l'issue de cette étude soutiennent le rôle potentiel de SmHDAC8 dans la modulation du cytosquelette d'actine *via* son interaction spécifique avec la GTPase SmRho1.1. Ainsi, nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1 et nous avons montré qu'elle était bien présente chez le parasite. L'acétylation de SmRho1 sur la lysine K136 a également été mise en évidence par spectrométrie de masse et nous avons aussi pu observer un effet significatif de l'inhibition de SmHDAC8 sur l'organisation du cytosquelette d'actine des vers adultes et des schistosomules.

Deux isoformes de SmRho1 (SmRho1.1 et SmRho1.2) ont également été identifiées et nous avons pu mettre en évidence une interaction spécifique entre SmHDAC8 et SmRho1.1 qui semble impliquer le domaine C-terminal de cette dernière. Enfin, les premières données obtenues concernant la spécificité d'interaction entre SmRho1.2 et SmDia suggèrent que la voie de signalisation médiée par SmRho1 et indirectement par SmHDAC8 semble bien différente de celle présente chez l'Homme.

DISCUSSION, CONCLUSIONS
ET PERSPECTIVES
GENERALES

Comme nous l'avons souligné précédemment, le Praziquantel représente à l'heure actuelle l'unique traitement efficace dans la lutte contre la schistosomiase. C'est un médicament peu coûteux, actif contre toutes les espèces de schistosome et administré par voie orale en dose unique, sans effets secondaires notables. Toutefois, le manque d'efficacité contre les parasites immatures conduisant dans certains cas à l'échec du traitement, constitue un inconvénient majeur. De plus, son utilisation à long terme en tant que médicament unique soulève des inquiétudes puisque cela a favorisé l'émergence de souches tolérantes/résistantes, soulignant ainsi le besoin urgent de développer des nouveaux agents anti-schistosomes.

Le ciblage de l'épigénome parasitaire et notamment des KDACs constitue une stratégie nouvelle dans la lutte contre plusieurs parasites appartenant aux genres *Schistosoma*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* et *Leishmania*. Chez *S. mansoni*, SmHDAC8 nous a rapidement apparu comme une cible thérapeutique prometteuse puisqu'elle montre plusieurs différences structurales au niveau de la poche catalytique par rapport aux autres membres de cette classe, que nous avons déjà évoquée antérieurement. De plus, rappelons que l'inactivation des transcrits de SmHDAC8 par ARNi dans un modèle murin, réduit significativement le nombre de vers et donc le nombre d'œufs montrant ainsi que cette enzyme est essentielle au développement du parasite chez l'hôte définitif et qu'elle représente un cible thérapeutique prometteuse (Marek et al. 2013).

La résolution de la structure cristallographique de l'enzyme parasitaire (Marek et al. 2013) nous a également permis d'obtenir des informations précieuses sur les différences structurales entre SmHDAC8 et l'enzyme humaine ainsi que sur les mécanismes d'inhibition par des inhibiteurs non sélectifs, tels que le SAHA par exemple.

Ces nombreux travaux ont donc permis d'une part de mettre en évidence l'intérêt de cibler SmHDAC8 et d'autre part qu'il était possible de développer et de bio-optimiser des inhibiteurs de plus en plus sélectifs et actifs (Heimburg et al. 2016).

Dans ce contexte, les différentes données que nous avons réunies à l'issue de ce projet de thèse nous ont permis de mieux cerner le rôle de SmHDAC8 dans la biologie du parasite et de confirmer son potentiel en tant que cible thérapeutique. Néanmoins, certains aspects, que nous allons discuter dans cette partie, concernant les partenaires ainsi que la signalisation impliquant SmHDAC8 et la GTPase SmRho1 restent non élucidés et nécessitent d'être plus approfondis.

- Fonctions biologiques de SmHDAC8

La diversité des protéines identifiées par le criblage en double hybride chez la levure et l'expérience de co-IP/MS suggèrent que SmHDAC8 participe à un vaste réseau d'interactions qui régule probablement différents aspects de la physiologie du parasite. Au total, 209 protéines ont été identifiées par ces deux approches différentes mais complémentaires. Les partenaires de SmHDAC8 sont impliqués dans environ 40 processus différents tels que le complexe cohésine, l'organisation du cytosquelette, la régulation de la transcription et de la traduction, le

métabolisme, la réparation de l'ADN ou encore le cycle cellulaire. De plus, nos résultats montrent que SmHDAC8 est une désacétylase potentiellement impliquée à la fois dans des processus cytosoliques et nucléaires.

Les partenaires protéiques de SmHDAC8 que nous avons mis en évidence sont également des orthologues de protéines non précédemment identifiées comme substrats ou partenaires de l'enzyme HDAC8 humaine. Bien que nous ne nous attendions pas nécessairement à détecter des substrats en utilisant ces deux méthodologies, il est intéressant d'observer qu'aucune des protéines partenaires détectées par *Joshi et al. (2013)* n'étaient parmi les protéines présentes dans l'interactome de SmHDAC8. En revanche, certaines sont impliquées dans des processus biologiques communs tels que le transport des protéines et des ions, le métabolisme et le cycle cellulaire. Notons toutefois que l'étude de *Joshi et al.* a utilisé des KDACs marquées et surexprimées dans une lignée de lymphoblastes T, limitant ainsi les partenaires potentiels de HDAC8 à un sous-ensemble de protéines exprimées dans ces cellules. Dans notre cas, l'expérience de co-IP/MS a été réalisée sur des extraits de protéines de vers adultes de *S. mansoni*, qui est un parasite complexe comprenant une variété de type cellulaire. De plus, il nous a été impossible de surexprimer SmHDAC8 pour augmenter les possibilités de détecter des interactions.

L'expérience de co-IP/MS ne nous a pas seulement permis d'identifier les protéines auxquelles les KDACs se lient directement, mais aussi les interactants faisant partie de complexes multiprotéiques. Ainsi, l'étude de *Joshi et al. (2013)* a mis en évidence les membres du complexe cohésine (SMC1A, SMC3 et SA2) comme partenaires de HsHDAC8 mais n'a pourtant pas identifié un autre composant du complexe qui est Rad21. Dans notre cas, c'est la réalisation d'un criblage de banque d'ADNc de *S. mansoni*, par la technique du double hybride en levure qui nous a permis d'identifier les protéines se liant directement à SmHDAC8, comme par exemple la GTPase SmRho1 et la protéine SmRad21. À noter, que cette dernière est l'unique membre du complexe cohésine que nous avons retrouvée. Toutefois, cette technique détecte également les interactions non spécifiques entre des protéines qui ne sont jamais en contact dans la cellule. C'est pourquoi, les liaisons entre SmHDAC8 et les deux candidats, SmRad21 et SmRho1 ont été investiguées de manière plus approfondie (*Caby et al. en préparation*).

Malgré le fait que nous n'avons pas mis en évidence les mêmes partenaires protéiques que *Joshi et al.*, il serait imprudent de supposer que ceux que nous avons retrouvés soient spécifiques de l'enzyme parasitaire. Il est aussi probable qu'un certain nombre des protéines interagissent avec HsHDAC8 lorsqu'elles seront étudiées individuellement. Néanmoins, en prenant en compte les différences structurelles entre l'enzyme du schistosome et l'enzyme humaine, et notamment au niveau des boucles non structurées situées à la surface de SmHDAC8, représentées par des insertions dans la séquence du domaine catalytique, nous pouvons supposer que des partenaires spécifiques de l'enzyme parasitaire ont été identifiés. De plus, certaines protéines que nous avons trouvées dans l'interactome de SmHDAC8 n'ont pas d'orthologues humaines et ont des fonctions inconnues. D'autres travaux futurs devraient donc nous permettre de déterminer quelles protéines partenaires sont spécifiques du schistosome, comment elles interagissent avec SmHDAC8 et quel est le rôle de ces interactions dans la biologie du parasite.

Par ailleurs, d'autres expériences pourraient être effectuées afin d'identifier les substrats de SmHDAC8. Le niveau d'acétylation des protéines du parasite serait étudié, d'une part après interférence du transcrit de SmHDAC8 et d'autre part après inhibition de l'enzyme, en utilisant la spectrométrie de masse. L'invalidation du transcrit codant pour la protéine SmHDAC8 serait réalisée par la technique d'ARNi sur des couples de vers adultes. La technique d'ARNi couramment utilisée au laboratoire, consiste à transférer par électroporation des couples de vers adultes avec de l'ARN double brin (dsRNA). Après 5 jours de culture, les ARN(s) ainsi que les protéines sont extraits. La diminution des transcrits de SmHDAC8 sera évaluée par RT-PCR quantitative et la quantité de protéine SmHDAC8, analysée par Western Blot. Un extrait protéique issu de couples de vers adultes non interférés pourra être utilisé, en parallèle, comme témoin. D'une part, cet échantillon nous permettra de déterminer l'acétylome global du parasite après analyse en spectrométrie de masse. D'autre part, la comparaison du niveau d'acétylation des protéines issues de parasites interférés et non interférés nous permettra d'identifier les substrats de SmHDAC8, qui devraient être suracétylés. L'inhibition de SmHDAC8 sera réalisée à l'aide d'inhibiteurs sélectifs de SmHDAC8. Nous utiliserons dans un même temps, la protéine SmSMC3 comme contrôle positif d'inhibition. En effet, nous avons pu démontrer qu'elle était un substrat de SmHDAC8. Une suracétylation de SmSMC3 sera donc observée après interférence ou inhibition de SmHDAC8 (*Caby et al, en préparation*). Enfin, à l'aide de cette même approche, il sera possible de déterminer les lysines ciblées par SmHDAC8 sur d'autres protéines.

Bien que les travaux *in vivo*, ou sur des cellules en culture n'ont pas démontré que les histones étaient des substrats de l'enzyme HDAC8 humaine et qu'elle n'était pas non plus retrouvée au sein de complexe multiprotéiques régulant la transcription des gènes, il serait néanmoins intéressant d'identifier les gènes dont l'expression est régulée par SmHDAC8. Une étude réalisée avec l'utilisation de l'inhibiteur sélectif de SmHDAC8, le TH65, est d'ailleurs en cours d'analyse en collaboration avec l'équipe du Pr. S. Verjovski-Almeida (*Sao Paolo, Brésil*) où les changements dans le profil de l'expression des gènes et de l'acétylation des histones ont été étudiés par RNAseq et ChiP-seq.

- [Un rôle pour SmHDAC8 dans la voie de signalisation Rho-dépendante ?](#)

L'interaction entre SmHDAC8 et la GTPase SmRho1 que nous avons identifiée par criblage en double hybride chez la levure et que nous avons confirmée chez *S. mansoni*, nous a amenés à nous poser plusieurs questions et émettre diverses hypothèses quant à la relation qu'il pourrait exister entre ces deux protéines. Il était donc évident, dans un premier temps d'envisager que SmRho1 puisse être un substrat de SmHDAC8 et donc de déterminer si la GTPase pouvait être acétylée. L'acétylation de SmRho1 a donc été étudié tout d'abord chez le parasite et notamment chez le schistosomules puis à l'aide d'une analyse par spectrométrie de masse d'un extrait de vers adultes, où nous avons pu démontrer que SmRho1 était bien acétylée sur la lysine 136. Ces résultats ne sont cependant pas surprenants. Bien que le GTPase RhoA, ni même aucune autre RhoGTPase,

n'est été décrite pour être acétylée, *Hong et al.* ont identifié une acétylation sur la lysine 141 de la protéine Rho1 de *S. japonicum*. Toutefois, nous n'avons pas détecté cette modification sur la lysine 141 chez *S. mansoni*. De même, en position 136, *S. japonicum* possède une lysine dont l'acétylation n'a pas encore été mise en évidence. Maintenant que nous savons que SmRho1 est acétylé, il serait intéressant de déterminer si la GTPase est un substrat ou non de SmHDAC8. Cependant, que SmRho1 soit un substrat ou un partenaire de SmHDAC8, il est probable que cette interaction soit impliquée dans la régulation de l'activité GTPasique de cette dernière. SmHDAC8 pourrait également moduler l'affinité de la RhoGTPase pour ses multiples partenaires. Différentes études ont déjà montré que l'activité GTPase de RhoA était dépendante des modifications post-traductionnelles. Nous avons déjà pu citer le cas de la phosphorylation de RhoA par la PKA, qui régule négativement l'activation de ROCK (*Nusser et al, 2006*). Il existe aussi d'autres protéines non apparentées aux protéines GEF, GAP et GDI, qui vont moduler l'activité GTPasique des RhoGTPases. Prenons l'exemple de la protéine Memo qui interagit et semble favoriser la localisation membranaire de RhoA et donc son activation, au sein d'un complexe multiprotéique Memo-RhoA-mDia1 (*Zaoui et al. 2008*). En 2006, *Valderrama et al.* ont également démontré que la protéine F11L exprimée par le virus de la vaccine pouvait inhiber l'activité de RhoA. Plus récemment, une étude a aussi révélé que F11L était capable d'interagir avec la RhoGAP Myosin-9A *via* son domaine PDZ-like. Cette interaction va alors induire l'inhibition de RhoA et augmenter la propagation du virus (*Handa et al. 2013*). En résumé, F11L joue donc un rôle d'inhibiteur de RhoA en recrutant et facilitant le rapprochement de la RhoGAP et de RhoA. Il existe donc des protéines régulatrices que l'on pourrait qualifier de « régulateurs atypiques » dont pourrait faire partie SmHDAC8.

Mais alors pourrait-on également envisager qu'une seule des deux isoformes de SmRho1 soit acétylée ? En effet, nous avons montré en système d'expression hétérologue, une spécificité d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1 qu'il serait bien évidemment essentiel de confirmer chez le parasite. Dans ce cas, l'acétylation spécifique de SmRho1.1 et la désacétylation potentielle par SmHDAC8 de la GTPase pourrait constituer un mécanisme de régulation de la voie de signalisation médiée par SmRho1 spécifique au parasite. En revanche, la lysine que nous avons identifiée comme site d'acétylation sur SmRho1 est conservée chez les deux isoformes suggérant que les deux GTPases sont capables d'être acétylées et potentiellement désacétylées par la même KDAC. Cependant, aux vues des résultats obtenus concernant la spécificité d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1, il est possible que seul SmRho1.1 soit effectivement acétylé. Nous pouvons également proposer que SmRho1.2 puisse être désacétylé par une autre KDAC. Des expériences préliminaires de co-IP que nous avons réalisées chez la levure et en ovocytes de xénope semblent d'ailleurs montrer que SmRho1.1 serait la seule des deux isoformes à être acétylé. De plus, la présence même de deux isoformes suggère qu'elles participent à des processus de régulation distinctes où chaque isoforme aurait des effecteurs et régulateurs spécifiques. Ainsi chez l'Homme où RhoA possède un rôle central dans la voie de signalisation régulant l'organisation du cytosquelette d'actine et le réseau microtubulaire grâce à une multitude de partenaires, chez *S. mansoni*, les deux isoformes, par des interactions différentes, pourraient avoir des fonctions propres. De ce fait, dans le but d'investiguer de manière plus approfondie la voie de signalisation impliquant SmRho1 et SmHDAC8, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les deux isoformes de SmRho1 et un effecteur connu de

SmRho1, la forme SmDia (Quack *et al.* 2009). La mise en évidence d'une interaction spécifique entre SmDia-RBD et SmRho1.2, semble indiquer que chez *S. mansoni* il existe deux voies bien distinctes qui participent à l'organisation du cytosquelette *via* les deux isoformes de SmRho1. Dans ce cas, seul l'isoforme SmRho1.1 interagirait avec SmROCK par exemple, ce qu'il faudra démontrer. De même pour la protéine SmRhoGDI que nous avons retrouvé dans l'interactome de SmRho1 à la suite d'une analyse en spectrométrie de masse, est-elle un interactant voir un régulateur des deux isoformes ou seulement de SmRho1.1, ce qui constituerait un mécanisme de régulation de l'activité GTPasique des protéines Rho encore bien différent de celui de l'humain.

Chez *S. mansoni*, les partenaires des deux effecteurs SmROCK et SmDia sont inconnus. Néanmoins, il est important de rappeler que la cofiline a été retrouvée dans l'interactome de SmRho1, il est donc possible que, de la même manière que chez l'Homme, SmRho1 et plus particulièrement SmRho1.1 participe à la régulation du cytosquelette d'actine *via* ROCK, la LIMK et la cofiline (Cf : Introduction, partie III, « fonction biologiques des RhoGTPases »). De même pour SmDia, bien qu'elle interagisse spécifiquement avec SmRho1.2, nous ne connaissons pas ces interactants et ne savons donc pas comment ce complexe pourrait participer à la régulation de la polymérisation des filaments d'actine. Pourtant, en 2009, Quack *et al.* ont démontré que SmDia est capable d'interagir directement avec la protéine SmTK3 (Src-like Tyrosine-Kinase). Ce qui n'est pas surprenant puisque chez l'humain, le complexe RhoA-GTP/mDia/Scr régule la formation des filaments d'actine (Tominaga *et al.* 2000 ; Young *et Copeland* 2010).

Bien que les signaux activateurs des SmRho1.1 et SmRho1.2 soient inconnus, la particularité de la voie de signalisation régulant la polymérisation des filaments d'actine chez le parasite se définit, pour le moment, exclusivement par la présence des deux isoformes.

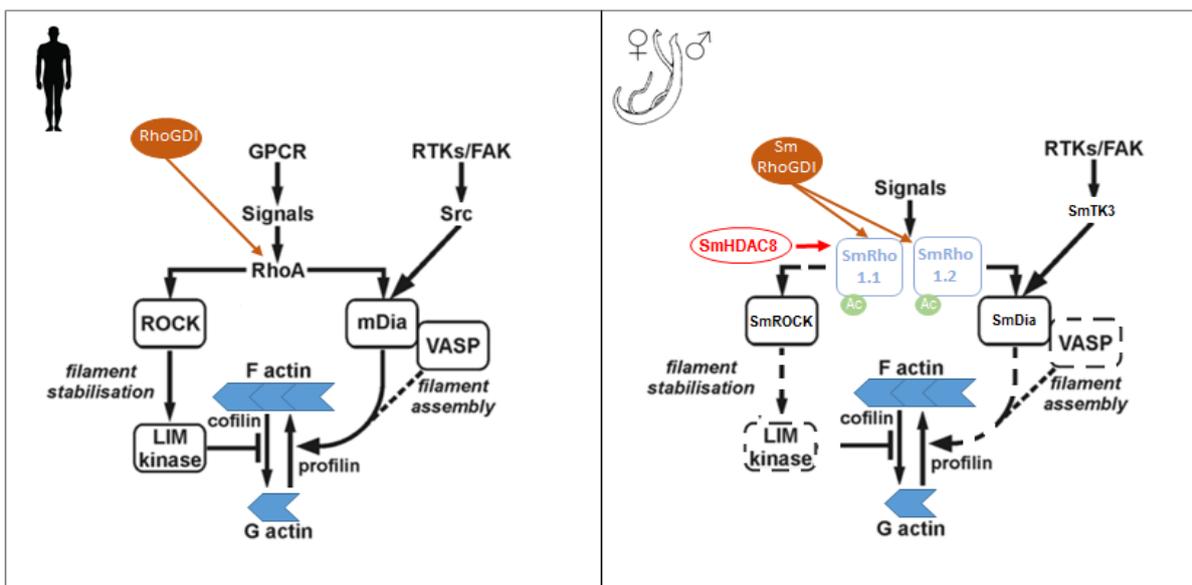


FIGURE 1 : Rôle de la GTPase RhoA humaine et de SmRho1 dans la voie de signalisation régulant l'organisation du cytosquelette d'actine (d'après Quack *et al.* 2009).

Chez l'Homme, la GTPase RhoA régule la formation des filaments d'actine *via* l'activation de ses effecteurs tels que ROCK et mDia. Chez *S. mansoni*, la présence des deux isoformes de SmRho1 semble indiquer l'existence de deux voies de signalisation distinctes.

La spécificité de liaison entre SmHDAC8 et SmRho1.1, nous a permis de mettre en évidence les potentiels motifs d'interaction entre SmHDAC8 et SmRho1.1 et nous avons pu montrer que le domaine C-terminal semblait être replié dans la fixation à SmHDAC8. Toutefois, il est nécessaire de rappeler que les mutants SmRho1. 1-88 aa et SmRho1. 1-143 aa n'interagissent pas avec SmHDAC8, car ce sont des fragments dont la structure tridimensionnelle a sans doute été affectée. C'est pourquoi, la production de mutants C-terminaux de SmRho1 a été entreprise afin de mettre en évidence le ou les acides aminés responsables de l'interaction avec SmHDAC8. Pour ce faire, la glutamine 147 et la valine 148 de SmRho1.1 ont été substitués respectivement par un acide glutamique et une asparagine. De même pour SmRho1.2, l'acide glutamique 147 et l'asparagine 148 ont été substitués par une glutamine et une valine. La lysine 151 et la sérine 153 de SmRho1.1 ainsi que les asparagines 151 et 153 de SmRho1.2 ont également été mutées (*Figure 2*).

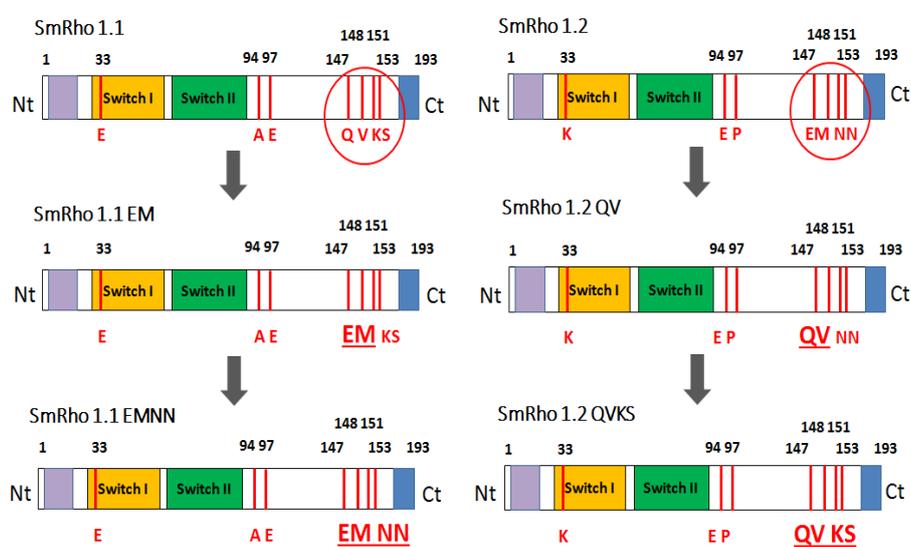


FIGURE 2 : Représentation schématique des différents mutants C-terminaux produit par mutagenèse dirigée à partir de SmRho1.1 et SmRho1.2.

Les ARNc de SmHDAC8 et différents mutants de SmRho1 ont été synthétisés et seront microinjectés en ovocytes de xénope afin d'étudier les interactions par colP. En parallèle, une collaboration avec le Dr Isabelle Landrieu (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576 Université de Lille 1) a été mise en place, afin de confirmer tout d'abord l'interaction entre les protéines recombinantes SmRho1.1 et SmHDAC8 et d'identifier les acides aminés de SmRho1.1 responsable de l'interaction, par RMN. Les premières données obtenues sont encourageantes puisqu'un premier spectre RMN pour la protéine SmRho1.1 marquée à l'azote 15 a été obtenu.

- Rôle de SmHDAC8 dans l'organisation du cytosquelette

Les résultats recueillis à l'issue des expériences réalisées en microscopie confocales nous ont apporté des informations supplémentaires quant au rôle de la protéine SmHDAC8 dans l'organisation du cytosquelette chez

S. mansoni. Ainsi, nous avons mis en évidence, par l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de SmHDAC8 (TH65), une désorganisation du réseau d'actine tégumentaire des vers adultes ainsi que de l'actine musculaire des schistosomules. Toutefois, il faut noter qu'en tant qu'inhibiteur, le TH65 n'agit que sur le pool de protéines présent. Il serait donc intéressant d'utiliser une approche complémentaire telle que l'ARNi, afin de cibler les transcrits codant pour SmHDAC8. De plus, de par les multiples interactants que possède l'enzyme parasite, nous ne savons pas si les phénotypes obtenus sont la conséquence d'une dérégulation de la voie de signalisation médiée par SmRho1 et SmHDAC8. Ainsi, dans le but de confirmer l'implication de la RhoGTPase, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de RhoA serait nécessaire afin d'observer une désorganisation du cytosquelette d'actine identique ou similaire à celle mise en évidence après traitement au TH65. Nous pouvons également envisager de déterminer l'impact de l'inhibition de SmHDAC8 sur le réseau microtubulaire et de réaliser différents marquages après l'interférence du transcrit de SmHDAC8 par RNAi et l'inhibition de l'enzyme par le TH65. En 2011, *Yamauchi et al.* ont d'ailleurs montré que l'interférence des transcrits codant pour la protéine HDAC8 humaine par siRNA provoquait une désorganisation du réseau microtubulaire de la cellule. Enfin, des colorations au rouge carmin de schistosomules et de vers adultes, traités ou non avec le TH65 pourraient également nous apporter des renseignements plus précis sur la fonction de SmHDAC8 dans l'organisation du cytosquelette. De ce fait, l'inhibition de l'enzyme pourrait avoir un impact sur la structure des différents organes, sur la migration, la différenciation et la morphologie des cellules du parasite.

En conclusion, les différents résultats que nous avons obtenus, nous ont permis d'identifier SmRho1 comme partenaire voir comme substrat potentiel de SmHDAC8. Cette interaction, qui a été confirmée chez le parasite, fait intervenir le domaine C-terminale de SmRho1.1 et aurait une fonction spécifique puisque les deux isoformes de la RhoGTPase semblent avoir des partenaires différents. Même si les bases structurales ainsi que la fonction précise de cette interaction n'ont pas encore été élucidé, il est clair que l'enzyme du schistosome est impliquée dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine, probablement *via* son interaction avec SmRho1.1. Cependant, la présence de deux voies d'activation médiées par SmRho1.1 d'une part et SmRho1.2 doit être confirmée. Des outils comme le CRISPR-Cas9, nous permettraient d'obtenir des parasites KO ou KO conditionnels afin d'étudier le rôle spécifique des gènes codant pour ces deux protéines à différents stades. Bien que cela ne soit actuellement pas possible, de nombreux projets concernant le développement de cette technologie chez le schistosome sont en cours.

Nous avons jusqu'à maintenant discuter des différents aspects concernant la liaison entre SmHDAC8 et SmRho1, mais qu'en est-il chez l'Homme ? Actuellement, aucune étude n'a démontré une interaction entre RhoA et l'enzyme HDAC8 humaine. Il serait donc intéressant de poursuivre nos expériences dans cette voie. Et nous pouvons déjà suggérer que HsRhoA est capable d'interagir avec HsHDAC8 puisque des expériences préliminaires, réalisées grâce aux protéines recombinantes humaines et à nos deux modèles d'expressions hétérologues, ont démontré cette interaction.

Enfin, l'implication de SmHDAC8 dans la régulation du cytosquelette, *via* son interaction avec SmRho1, ainsi que dans le complexe cohésine, *via* son interaction avec SmRad21, démontrent son importance dans le développement du parasite et soulignent son intérêt en tant que cible thérapeutique.

ANNEXE

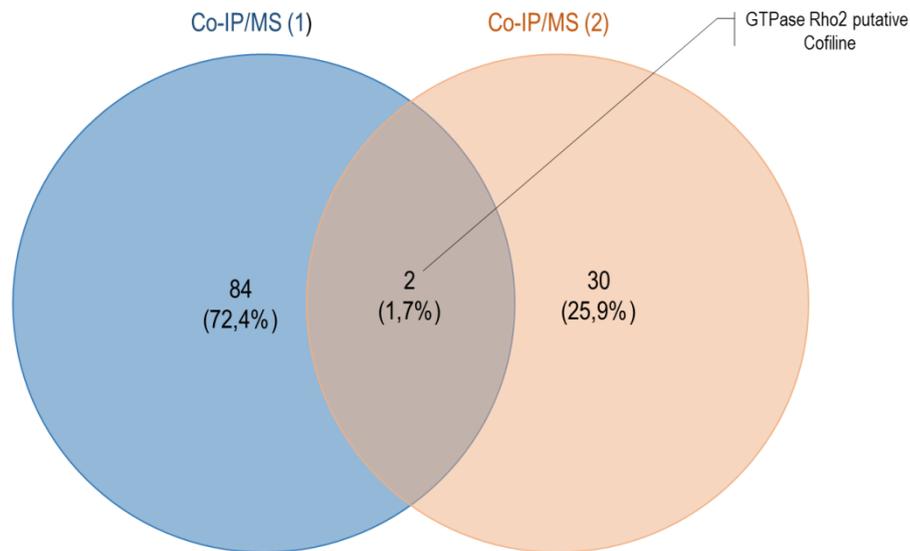


FIGURE 1 : Diagramme de Venn présentant les protéines identifiées par spectrométrie de masse, après IP de SmRho1.

Deux protéines sont communes aux deux IP effectuées : la cofiline (n° d'accension Uniprot : G4LZY0) et la RhoGTPase SmRho2 (n° d'accension Uniprot : G4V9A8).

Tableau 1 : Liste des protéines identifiées par colP/MS.

Protein name	Protein accession numbers	GO Processes (F : Molecular Function, P: Biological Process, C : Cellular Component)
Putative lysophosphatidic acid phosphatase	G4VDI7	F: acid phosphatase activity
Aldehyde dehydrogenase	Q94746	F: oxidoreductase activity
Titin, putative	G4M018	F: ATP binding, protein kinase activity
Putative alpha-actinin	G4VBW4	F: actin binding, calcium ion binding
Cdc50-related	G4VDI8	—
Calcium-transporting ATPase	G4V FY6	F: ATP binding, calcium-transporting ATPase activity; C: integral component of membrane, sarcoplasmic reticulum membrane
Calcium-transporting ATPase	Q27779	F: ATP binding, calcium-transporting ATPase activity; C: integral component of membrane, sarcoplasmic reticulum membrane
Putative rho GTPase	G4VBR2	F: GTPase activity, GTP binding; P: small GTPase mediated signal transduction ; C: intracellular, membrane
Putative alpha-actinin	G4VBW5	F: calcium ion binding
Cell polarity protein	G4VC76	F: GTPase activity, GTP binding; P: small GTPase mediated signal transduction ; C: intracellular, membrane
Calcium-transporting ATPase 1	O96527	F: ATP binding, calcium-transporting ATPase activity; C: integral component of membrane, sarcoplasmic reticulum membrane
Putative uncharacterized protein	G4V802	F: motor activity; C: myosin complex

Putative uncharacterized protein	C1M0L0	F: RNA binding
26s proteasome regulatory particle subunit putative	G4LUF4	F: enzyme regulator activity; P: regulation of protein catabolic process ; C: proteasome complex
Putative rho2 GTPase	G4V9A8	F: GTPase activity, GTP binding; P: small GTPase mediated signal transduction ; C: intracellular, membrane
Coatomer subunit beta	G4VCJ4	F: structural molecule activity; P: ER to Golgi vesicle-mediated transport, intracellular protein transport, intra-Golgi vesicle-mediated transport, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER ; C: COPI vesicle coat, Golgi membrane
Putative importin-beta 3	G4VSF4	F: nuclear localization sequence binding, protein transporter activity, Ran GTPase binding; P: NLS-bearing protein import into nucleus, protein import into nucleus, translocation, ribosomal protein import into nucleus ; C: cytoplasm, nuclear membrane, nuclear periphery
Taurocyamine kinase	P16641	F: ATP binding, metal ion binding, oxidoreductase activity, Taurocyamine kinase activity
Sec24-related C	G4VKC5	F: zinc ion binding; P: ER to Golgi vesicle-mediated transport, intracellular protein transport ; C: COPII vesicle coat
Pyruvate carboxylase	G4V7Q4	F: ATP binding, biotin binding, biotin carboxylase activity, metal ion binding, pyruvate carboxylase activity; P: gluconeogenesis, pyruvate metabolic process
Putative alpha-actinin	G4V935	F: actin binding, calcium ion binding
Tegument-associated antigen	B8YCP4	F: calcium ion binding; P: microtubule-based process ; C: dynein complex
AP complex subunit beta	G4V844	F: protein transporter activity; P: intracellular protein transport, vesicle-mediated transport ; C: clathrin adaptor complex
Putative eukaryotic translation elongation factor	G4VI95	F: GTPase activity, GTP binding, translation elongation factor activity
Kinesin-like protein	G4V5R8	F: ATP binding, ATP-dependent microtubule motor activity, plus-end-directed, microtubule binding; P: axon guidance, cytoskeleton-dependent intracellular transport; microtubule-based movement, protein localization ; C: kinesin complex
Importin-alpha re-exporter (Chromosome segregation 1-like protein)	G4LYD9	F: nuclear export signal receptor, Ran GTPase binding; P: protein export from nucleus, protein import into nucleus ; C: cytosol, nuclear envelope
Putative spectrin beta chain, brain 3 (Spectrin, non-erythroid beta chain 3) (Beta-IV spectrin)	G4VDE6	F: actin binding, phospholipid binding, structural constituent of cytoskeleton; P: actin filament capping ; C: spectrin
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	G4VGA5	F: ATP binding, metal ion binding, sodium: potassium-exchanging ATPase activity; C: integral component of membrane
Putative ubiquitin-activating enzyme e1	G4VH12	F: structural molecule activity; P: proteasome assembly, ubiquitin-dependent protein catabolic process ; C: proteasome regulatory particle, lid subcomplex
26S proteasome subunit S9, putative	G4LUP0	F: structural molecule activity; P: proteasome assembly, ubiquitin-dependent protein catabolic process ; C: proteasome regulatory particle, lid subcomplex
Putative eukaryotic translation elongation factor	G4VI96	F: GTPase activity, GTP binding, translation elongation factor activity; P: translation ; C: intracellular
Putative leucine zipper-ef-hand containing transmembrane protein	G4VCR1	F: calcium ion binding, ribosome binding; P: cellular metal ion homeostasis ; C: integral component of membrane, mitochondrial inner membrane
Family M13 non-peptidase homologue (M13 family)	G4V669	F: metalloendopeptidase activity; C: integral component of membrane
Spectrin beta chain, brain 4 putative	C4QKY6	F : calcium ion binding
Putative 60s acidic ribosomal protein P2	G4VFI4	F : structural constituent of ribosome ; P : cytoplasmic translation, translational elongation ; C : cytosolic large ribosomal subunit
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	Q95WT4	F: ATP binding, metal ion binding, sodium: potassium-exchanging ATPase activity; C: integral component of membrane

Heat shock protein 70 (Hsp70)-4, putative	C4QFY0	F: ATP binding; P: Stress response
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	G4VGA0	F: ATP binding, metal ion binding, sodium:potassium-exchanging ATPase activity ; C: integral component of membrane
Putative p30 dbc protein	G4VSY0	F: regulation of transcription, DNA-templated
Putative uncharacterized protein	G4VE00	–
Putative clathrin heavy chain	G4VAK2	F: structural molecule activity; P: intracellular protein transport, vesicle-mediated transport ; C: clathrin coat of coated pit, clathrin coat of trans-Golgi network vesicle, integral component of membrane
Putative nascent polypeptide associated complex alpha subunit (Nac alpha)	G4VGM8-G4VGM9	C: nascent polypeptide-associated complex
Prominin protein, putative	G4LYQ2	C: integral component of membrane
Putative succinate dehydrogenase	G4V6D5	F: heme binding, metal ion binding, ubiquinone binding; P: mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone, tricarboxylic acid cycle ; C: integral component of membrane, mitochondrial respiratory chain complex II, succinate dehydrogenase complex (ubiquinone)
Uncharacterized protein	G4VGG5	–
Proteasome catalytic subunit 3 (T01 family)	G4VP46	F: threonine-type endopeptidase activity; P: proteolysis involved in cellular protein catabolic process ; C: nucleus, proteasome core complex
Neutral alpha-glucosidase ab (Glucosidase II alpha subunit) (Alpha glucosidase 2), putative	G4M039	F: carbohydrate binding, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; P: carbohydrate metabolic process
Glutathione-s-transferase omega,	G4M1D9	F: transferase activity
Putative alanyl-tRNA synthetase	G4VNT2	F: alanine-tRNA ligase activity, amino acid binding, ATP binding, tRNA binding, zinc ion binding; P: alanyl-tRNA aminoacylation, tRNA modification ; C: cytoplasm
SPRY domain containing protein	G4VQJ8	–
DEAD box ATP-dependent RNA helicase, putative	G4LXB6	F: ATP binding, ATP-dependent RNA helicase activity, nucleic acid binding; P: regulation of gene expression, RNA secondary structure unwinding, RNA splicing ; C: catalytic step 2 spliceosome, cytoplasm, nucleolus
Putative spectrin beta chain, brain 4	G4V8A5	F: nucleic acid binding, zinc ion binding
Putative rap1 and	G4VE67A	F: GTPase activity, GTP binding; P: signal transduction ; C: membrane
Cofilin	G4LZY0	F: actin binding; P: actin filament depolymerization ; C: actin cytoskeleton
Putative adenylate kinase 1	G4VNE5	F: adenylate kinase activity, ATP binding
Elongation factor Tu	G4V779	F: GTPase activity, GTP binding, translation elongation factor activity; C: intracellular
Putative glyoxalase II (Hydroxyacylglutathione hydrolase)	G4VRK1	F: hydroxyacylglutathione hydrolase activity; P: methylglyoxal catabolic process to D-lactate via S-lactoyl-glutathione
Kettin/titin-related protein	G4V6Y5	–
200-kDa GPI-anchored surface glycoprotein	G4VP56-Q26607	–
Elongation factor Tu	G4V780	F: GTPase activity, GTP binding, translation elongation factor activity; C: intracellular
Clathrin heavy chain	G4VAK4A	F: clathrin light chain binding; P: clathrin coat assembly, intracellular protein transport, vesicle-mediated transport ; C: clathrin-coated pit, clathrin complex, cytoplasmic vesicle membrane
Rab6, putative	G4LXF1	F: GTPase activity, GTP binding; P: intra-Golgi vesicle-mediated transport, retrograde transport, endosome to Golgi, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER ; C: cytosol, Golgi apparatus

Dynamamin, putative	tC4Q9B4	F: GTPase activity, GTP binding, microtubule binding; P: clathrin-dependent endocytosis, dynamin family protein polymerization involved in mitochondrial fission, membrane fusion, mitochondrial fission ; C: mitochondrial membrane
26s proteasome regulatory particle subunit, putative	G4LUF5	F: enzyme regulator activity; P: regulation of protein catabolic process ; C: proteasome complex
Putative gynecophoral canal protein	G4VG71	–
Gynecophoral canal protein	Q26557	–
Putative uncharacterized protein	G4VE01	–
Putative ankyrin 2,3/unc44	G4VKA7	F: spectrin binding; P: protein targeting to plasma membrane, signal transduction ; C: cytoplasm
Putative dynamin	G4V9H8	F: GTPase activity, GTP binding, microtubule binding; P: dynamin family protein polymerization involved in mitochondrial fission membrane fusion, mitochondrial fission ; C: mitochondrial membrane
Putative importin beta-1	G4VHN1	F: nuclear localization sequence binding, protein transporter activity, Ran GTPase binding; P: NLS-bearing protein import into nucleus, protein import into nucleus, translocation, ribosomal protein import into nucleus ; C: cytoplasm, nuclear membrane, nuclear periphery
Putative uncharacterized protein	O17461	–
26S proteasome subunit RPT4	A9NI61-G4VTJ6	F: ATP binding, hydrolase activity; P: protein catabolic process ; C: cytoplasm, proteasome complex
Uncharacterized protein	G4VT07	F: acetylcholine-gated channel complex
Putative sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP)	G4VLG0	F: calcium ion binding
Putative titin	G4V6G9	–
Putative adp, ATP carrier protein	G4VP51	F: ATP:ADP antiporter activity; P: regulation of mitochondrial membrane permeability ; C: integral component of membrane, mitochondrial inner membrane
Putative 60s ribosomal protein L12	G4V9G5	F: rRNA binding, structural constituent of ribosome; P: ribosomal large subunit assembly translation ; C: cytosolic large ribosomal subunit
Cell polarity protein	G4VK20	F: GTPase activator activity, Rab GTPase binding, syntaxin binding; P: regulation of exocytosis, regulation of protein secretion ; C: cytoplasm, plasma membrane
RNA and export factor binding protein, putative	tG4LZ21	F: RNA binding
Putative rab15, 13, 10, 1, 35, 5,	G4V9C3	F: GTPase activity, GTP binding; P: ER to Golgi vesicle-mediated transport ; C: endoplasmic reticulum membrane, Golgi membrane, integral component of membrane
Putative methylthioadenosine phosphorylase	G4VP86	F: S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase activity; P: L-methionine salvage from methylthioadenosine, purine ribonucleoside salvage ; C: cytoplasm, nucleus
60S ribosomal protein L14, putative	G4M1F3	F: RNA binding, structural constituent of ribosome; P: ribosomal large subunit biogenesis, translation ; C: cytosolic large ribosomal subunit
60S ribosomal protein L14, putative	Q15ER7	F: RNA binding, structural constituent of ribosome; P: ribosomal large subunit biogenesis, translation ; C: cytosolic large ribosomal subunit
Proteasome subunit alpha type	G4LZ69	F: threonine-type endopeptidase activity; P: ubiquitin-dependent protein catabolic process ; C: cytoplasm, nucleus, proteasome core complex, alpha-subunit complex
Rho GDP-dissociation inhibitor-related	G4VK76	F: Rho GDP-dissociation inhibitor activity; C: cytoplasm
Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11	G4VN62	F: peptidase activity, serine-type peptidase activity; P: signal peptide processing ; C: integral component of membrane, signal peptidase complex
Putative methylthioadenosine	G4VP86	F: S-methyl-5-thioadenosine phosphorylase activity; P: L-methionine

phosphorylase		salvage from methylthioadenosine, purine ribonucleoside salvage ; C: nucleus, cytoplasm
PRX_like2 domain-containing protein	G4VHC0	F: antioxidant activity; P: oxidation-reduction process
Putative myosin light chain 1	G4VBS3	F: calcium ion binding
Hsp90 co-chaperone (Tebp), putative	G4LW12	–
SUMO-conjugating enzyme	G4VRA7	F: ATP binding, SUMO transferase activity; C: cytoplasm, nucleus
Universal stress protein G, putative	G4LZ13	F: response to stress
Putative dna repair protein xpE	G4VJV2	F: damaged DNA binding; P: nucleotide-excision repair proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process ; C: cullin-RING ubiquitin ligase complex, nucleus
Calponin	P91888	F: actin binding, calmodulin binding; P: actomyosin structure organization
Calpain (C02 family)	G4VAG2	F: calcium-dependent cysteine-type endopeptidase activity, calcium ion binding; P: proteolysis ; C: cytoplasm
Putative mitochondrial import receptor subunit tom22	G4VLT9-G4VLU0	P: protein import into mitochondrial matrix, protein import into mitochondrial outer membrane ; C: integral component of mitochondrial outer membrane, mitochondrial outer membrane translocase complex
Putative soluble NSF attachment protein (SNAP)	G4VBQ1	F: soluble NSF attachment protein activity, syntaxin binding; P: intracellular protein transport, membrane fusion, SNARE complex disassembly ; C: SNARE complex, vacuolar membrane
ADP-ribosylation factor, arf, putative	G4LXT7	F: GTP binding; P: small GTPase mediated signal transduction ; C: intracellular
Cell polarity protein	G4VK21	
Tegumental antigen	I4EC26	F: calcium ion binding; P: microtubule-based process ; C: dynein complex
Serine/threonine-protein phosphatase	G4VGS2	F: metal ion binding, phosphoprotein phosphatase activity
Putative uncharacterized protein	G4VI75	–
Putative uncharacterized protein	G4LWD1	–
Calmodulin 1	E9LZR7	F: calcium ion binding
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K	G4LUZ0	F: ribosome binding, translation initiation factor activity; P: formation of translation preinitiation complex, regulation of translational initiation ; C: eukaryotic 43S preinitiation complex, eukaryotic 48S preinitiation complex, eukaryotic translation initiation factor 3 complex
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G, putative	G4LWV8	F: ATP binding, ubiquitin protein ligase activity, ubiquitin protein ligase binding; P: protein polyubiquitination, ubiquitin-dependent protein catabolic ; C: cytoplasm
WD-repeat protein, putative	G4M057	F: actin filament binding; P: actin filament depolymerization, locomotion, positive regulation of actin filament depolymerization, sarcomere organization ; C: actomyosin, actin portion, cortical actin cytoskeleton
Putative vacuolar ATP synthase subunit g	G4VCG8	F: hydrolase activity, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances; P: proton transport ; C: vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex
Putative cathepsin C	G4VG42	F: cysteine-type endopeptidase activity; P: proteolysis involved in cellular protein catabolic process ; C: extracellular space, lysosome
Putative coatomer epsilon subunit	G4VG55	F: structural molecule activity; P: ER to Golgi vesicle-mediated transport, intra-Golgi vesicle-mediated transport, retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER ; C: COPI vesicle coat, cytoplasm
Putative chloride intracellular channel	G4VGU2	–
Putative uncharacterized protein	G4LW12	–

ANNEXE

ATP synthase gamma subunit, putative	G4LVB6	F: proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; P: ATP synthesis coupled proton transport ; C: proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1)
Putative rab-2,4,14	G4VRU0	F: GTPase activity, GTP binding
Serine/threonine-protein phosphatase	G4VGS4	F: metal ion binding, phosphoprotein phosphatase activity

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Adra CN, Ko J, Leonard D, Wirth LJ, Cerione RA, Lim B. Identification of a novel protein with GDP dissociation inhibitor activity for the ras-like proteins CDC42Hs and Rac 1. *Genes, Chromosom. Cancer*. 1993;8(4):253–61.
- Adra CN, Manor D, Ko JL, Zhu S, Horiuchi T, Van Aelst L, et al. RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94(9):4279–84.
- Allal C, Favre G, Couderc B, Salicio S, Sixou S, Hamilton AD, et al. RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription. *J. Biol. Chem.* 2000;275(40):31001–8.
- Alves CC, Araujo N, dos Santos VCF, Couto FB, Assis NRG, Morais SB, et al. Sm29, but Not Sm22.6 Retains its Ability to Induce a Protective Immune Response in Mice Previously Exposed to a *Schistosoma mansoni* Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9(2).
- Amano M. Formation of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions Enhanced by Rho-Kinase Formation of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions Enhanced by Rho-Kinase. *Data Process.* [Internet]. 2010;1308(1988):1308–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9036856>
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*. 2010;67(9):545–54.
- Amin SA, Adhikari N, Jha T. Structure-activity relationships of hydroxamate-based histone deacetylase-8 inhibitors: Reality behind anticancer drug discovery. *Future Med. Chem.* 2017. p. 2211–37.
- Aronheim A, Engelberg D, Li N, Al-Alawi N, Schlessinger J, Karin M. Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell*. 1994;78(6):949–61.

-B-

- Bakal CJ, Finan D, LaRose J, Wells CD, Gish G, Kulkarni S, et al. The Rho GTP exchange factor Lfc promotes spindle assembly in early mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005a;102(27):9529–34.
- Bakal CJ, Finan D, LaRose J, Wells CD, Gish G, Kulkarni S, et al. The Rho GTP exchange factor Lfc promotes spindle assembly in early mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2005b;102(27):9529–34. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504190102>
- Balamatsias D, Kong AM, Waters JE, Sriratana A, Gurung R, Bailey CG, et al. Identification of P-Rex1 as a novel Rac1-guanine nucleotide exchange factor (GEF) that promotes actin remodeling and GLUT4 protein trafficking in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2011;286(50):43229–40.
- Ban R, Irino Y, Fukami K, Tanaka H. Human Mitotic Spindle-associated Protein PRC1 Inhibits MgcRacGAP Activity toward Cdc42 during the Metaphase. *J. Biol. Chem.* 2004;279(16):16394–402.
- Barrie G JM. *Schistosoma: Biology, Pathology and Control*. 2016.
- Bartolini F, Gundersen GG. Formins and microtubules. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;1803(2):164–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.07.006>
- Basant A, Glotzer M. Spatiotemporal Regulation of RhoA during Cytokinesis. *Curr. Biol.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;in press(9):R570–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.045>
- Basch PF. Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitol. Today*. 1990;6(5):160–3.

BIBLIOGRAPHIE

- Basch PF. Schistosomes: development, reproduction, and host relations. New York Oxford Univ. Press. 1991. 1991;43.
- 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. p. 497–520.
- Bento CF, Puri C, Moreau K, Rubinsztein DC, Aguilera MO, Berón W, et al. The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. J. Cell Sci. [Internet]. 2013;126(Pt 5):1059–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23620509>
- Berhe N, Gundersen SG, Abebe F, Birrie H, Medhin G, Gemetchu T. Praziquantel side effects and efficacy related to *Schistosoma mansoni* egg loads and morbidity in primary school children in north-east Ethiopia. Acta Trop. 1999;72(1):53–63.
- Bernards A, Settleman J. GEFs in growth factor signaling. Growth Factors. 2007;25(5):355–61.
- Bexkens ML, Balkom BWM Van, Wu Y, Smit CH, Hokke CH, Groot PG De, et al. The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton. Int. J. Parasitol. [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2011;41(5):523–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.005>
- Blander G, Guarente L. The Sir2p family of protein deacetylases. Annu Rev Biochem [Internet]. 2004;73:417–35. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15189148
- Bobek LA, Rekosh DM, Loverde PT. Small Gene Family Encoding an Eggshell (Chorion) Protein of the Human Parasite *Schistosoma mansoni*. 1988;8(8):3008–16.
- Boissier J, Kincaid-smith J, Berry A, Allienne J, Fillaux J, Toulza È. Changements globaux et infections parasitaires à mollusques vecteurs Un schistosome hybride atteint l' Europe. 2015;31.
- Brandt DT, Marion S, Griffiths G, Watanabe T, Kaibuchi K, Grosse R. Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. J. Cell Biol. 2007;178(2):193–200.
- Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Wilson A. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: A proteomic analysis after differential extraction. Proteomics. 2006;6(5):1471–82.
- Brindley PJ, Costa JMC Da, Srija B. Why Does Infection with Some Helminths Cause Cancer? Trends in Cancer. 2015. p. 174–82.
- Bu W, Lim KB, Yu YH, Chou AM, Sudhaharan T, Ahmed S. Cdc42 interaction with N-WASP and Toca-1 regulates membrane tubulation, vesicle formation and vesicle motility: Implications for endocytosis. PLoS One. 2010;5(8).
- Buggy JJ, Sideris ML, Mak P, Lorimer DD, McIntosh B, Clark JM. Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. Biochem. J. [Internet]. 2000;350(1):199–205. Available from: <http://www.biochemj.org/content/350/1/199.abstract>
- Bustelo XR. Vav family exchange factors: An integrated regulatory and functional view. Small GTPases. 2014.

-C-

Caby S, Pagliazzo L, Lancelot J, Saliou JM, Bertheaume N, Pierce RJ, et al. Analysis of the interactome of *Schistosoma mansoni* histone deacetylase 8. PLoS Negl. Trop. Dis. 2017;11(11):1–15.

BIBLIOGRAPHIE

- Cai J, Zuo Y, Wang T, Cao Y, Cai R, Chen FL, et al. A crucial role of SUMOylation in modulating Sirt6 deacetylation of H3 at lysine 56 and its tumor suppressive activity. *Oncogene*. 2016;35(37):4949–56.
- Calautti E, Grossi M, Mammucari C, Aoyama Y, Pirro M, Ono Y, et al. Fyn tyrosine kinase is a downstream mediator of Rho/PRK2 function in keratinocyte cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 2002;156(1):137–48.
- Camera P, Santos Da Silva J, Griffiths G, Giuffrida MG, Ferrara L, Schubert V, et al. Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nat. Cell Biol.* 2003;5(12):1071–8.
- Camera P, Schubert V, Pellegrino M, Berto G, Vercelli A, Muzzi P, et al. The RhoA-associated protein Citron-N controls dendritic spine maintenance by interacting with spine-associated Golgi compartments. *EMBO Rep.* 2008;9(4):384–92.
- Cardoso FC, Pacifico RNA, Mortara RA, Oliveira SC. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. *Clin. Exp. Immunol.* 2006;144(3):382–91.
- Carmoi T, Chevalier B, Debonne J, Klotz F. Bilharziose hépatique. 2010;1–19.
- Chakrabarti A, Melesina J, Kolbinger FR, Oehme I, Senger J, Witt O, et al. Targeting histone deacetylase 8 as a therapeutic approach to cancer and neurodegenerative diseases. *Future Med. Chem.* [Internet]. 2016;8(13):1609–34. Available from: <http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc-2016-0117>
- Chakrabarti A, Oehme I, Witt O, Oliveira G, Sippl W, Romier C, et al. HDAC8: A multifaceted target for therapeutic interventions. *Trends Pharmacol. Sci.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;36(7):481–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.013>
- Chan JD, Cupit PM, Gunaratne GS, McCorvy JD, Yang Y, Stoltz K, et al. The anthelmintic praziquantel is a human serotonergic G-protein-coupled receptor ligand. *Nat. Commun.* 2017;8(1).
- Cheever AW. *Schistosoma japonicum*: the pathology of experimental infection. *Exp. Parasitol.* 1985;59(1):1–11.
- Chen CL, Sung J, Cohen M, Chowdhury WH, Sachs MD, Li Y, et al. Valproic acid inhibits invasiveness in bladder cancer but not in prostate cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2006;319(2):533–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16868035>
- Chi X, Wang S, Huang Y, Stamnes M, Chen JL. Roles of Rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. p. 7089–108.
- Chiocca S, Segré C V. Regulating the regulators: The post-translational code of class i HDAC1 and HDAC2. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011.
- Colley DG, Andros TS, Campbell CH. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: What does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? *Infect. Dis. Poverty.* 2017.
- Collier FM, Gregorio-King CC, Gough TJ, Talbot CD, Walder K, Kirkland MA. Identification and characterization of a lymphocytic Rho-GTPase effector: Rhotekin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;324(4):1360–9.
- Copeland JW, Treisman R. The Diaphanous-related Formin mDia1 Controls Serum Response Factor Activity through its Effects on Actin Polymerization. *Mol. Biol. Cell.* 2002;13:4088–99.
- Corachan M, Escosa R, Mas J, Ruiz L, Campo E. CLINICAL PRESENTATION OF SCHISTOSOMA INTERCALATATUM INFESTATION. *Lancet.* 1987. p. 1139–40.
- Cory GOC, Cramer R, Blanchoin L, Ridley AJ. Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP. *Mol. Cell.* 2003;11(5):1229–39.

BIBLIOGRAPHIE

Côté JF, Motoyama AB, Bush JA, Vuori K. A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P₃-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat. Cell Biol.* 2005;7(8):797–807.

Côté JF, Vuori K. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.* 2007. p. 383–93.

Crellen T, Walker M, Lamberton PHL, Kabatereine NB, Tukahebwa EM, Cotton JA, et al. Reduced Efficacy of Praziquantel Against *Schistosoma mansoni* Is Associated with Multiple Rounds of Mass Drug Administration. *Clin. Infect. Dis.* 2016;63(9):1151–9.

Crespo P, Schuebel KE, Ostrom AA, Gutkind JS, Bustelo XR. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature.* 1997;385(6612):169–72.

Cringoli G. FLOTAC®, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia.* 2006. p. 381–4.

Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A, Vercruyse J, Utzinger J, et al. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nat. Protoc.* 2017;12(9):1723–32.

-D-

Di Cunto F, Calautti E, Hsiao J, Ong L, Topley G, Turco E, et al. Citron Rho-interacting kinase, a novel tissue-specific Ser/Thr kinase encompassing the Rho-Rac-binding protein citron. *J. Biol. Chem.* 1998;273(45):29706–11.

Di Cunto F, Imarisio S, Camera P, Boitani C, Altruda F, Silengo L, et al. Essential role of citron kinase in cytokinesis of spermatogenic precursors. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 24):4819–26.

Di Cunto F, Imarisio S, Hirsch E, Broccoli V, Bulfone A, Migheli A, et al. Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron.* 2000;28(1):115–27.

Dalton JP, Clough KA, Jones MK, Brindley PJ. The cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology.* 1997;114(2):105–12.

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

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

David G, Neptune MA, Depinho RA. SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J. Biol. Chem.* 2002;277(26):23658–63.

Deardorff MA, Bando M, Nakato R, Watrin E, Itoh T, Minamino M, et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature.* 2012;489(7415):313–7.

Degarege A, Degarege D, Veledar E, Erko B, Nacher M, Beck-Sague CM, et al. Plasmodium falciparum Infection Status among Children with Schistosoma in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016.

Degarege A, Erko B. Epidemiology of Plasmodium and helminth coinfection and possible reasons for heterogeneity. *Biomed Res. Int.* 2016.

Dose A, Liokatis S, Theillet FX, Selenko P, Schwarzer D. NMR profiling of histone deacetylase and acetyltransferase activities in real time. *ACS Chem. Biol.* 2011. p. 419–24.

BIBLIOGRAPHIE

Dovas A, Couchman JR. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem. J.* [Internet]. 2005;390(1):1–9. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20050104>

Dransart E, Olofsson B, Cherfils J. RhoGDIs revisited: Novel roles in Rho regulation. *Traffic*. 2005. p. 957–66.

Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 2016. p. 1372–401.

Dryden SC, Nahhas FA, Nowak JE, Goustin A-S, Tainsky MA. Role for Human SIRT2 NAD-Dependent Deacetylase Activity in Control of Mitotic Exit in the Cell Cycle. *Mol. Cell. Biol.* [Internet]. 2003;23(9):3173–85. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.23.9.3173-3185.2003>

Durkin ME, Yuan BZ, Zhou X, Zimonjic DB, Lowy DR, Thorgeirsson SS, et al. DLC-1: a Rho GTPase-activating protein and tumour suppressor. *J. Cell. Mol. Med.* [Internet]. 2007;11(5):1185–207. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1582-4934.2007.00098.x/asset/j.1582-4934.2007.00098.x.pdf?v=1&t=i3rhrqb5&s=fcb9cbb664b1593d24b5fd1b7c5a61b9176c171e>

Durst KL, Lutterbach B, Kummalue T, Friedman AD, Hiebert SW. The inv (16) Fusion Protein Associates with Corepressors via a Smooth Muscle Myosin Heavy-Chain Domain. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23(2):607–19.

-E-

Eblen ST, Slack JK, Weber MJ, Catling AD. Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal- regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes. *Mol. Cell. Biol.* 2002b;22(17):6023–33.

Ebrahim A, El-Morshedy H, Omer E, El-Daly S, Barakat R. Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997;57(6):706–8.

Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *Int. J. Mol. Sci.* 2017.

Erasmus DA. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and “unisexual” female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 1973;67(2):165–83.

Esteve P, Embade N, Perona R, Jiménez B, Del Peso L, León J, et al. Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene*. 1998;17(14):1855–69.

Esteve P, Peso LD, Lacal JC. Induction of apoptosis by rho in NIH 3T3 cells requires two complementary signals. Ceramides function as a progression factor for apoptosis. *Oncogene*. 1995;11(12):2656–65.

Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell*. 2001;106(4):489–98.

Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* [Internet]. 2003;421(6924):753–6.

Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12610628

Eva A, Aaronson SA. Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature*. 1985;316(6025):273–5.

-F-

Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014. p. 673–91.

Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994;51(1):83–8.

Faust CE, Jones CA H. Studies on Schistosomiasis in Puerto Rico. III. Biological studies. 2. The mammalian phase of the life-cycle. *Public Heal. Trop Med.* 1934;10:133–6.

Faye B, Ndiaye JL, Tine RC, Lo AC, Gaye O. [Interaction between malaria and intestinal helminthiasis in Senegal: influence of the carriage of intestinal parasites on the intensity of the malaria infection]. *Bull. la Soc. Pathol. Exot.* [Internet]. 2008;101(5):391–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19192606>

Finnin MS, Donigian JR, Pavletich NP. Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat. Struct. Biol.* 2001;8(7):621–5.

Fischle W, Dequiedt F, Fillion M, Hendzel MJ, Voelter W, Verdin E. Human HDAC7 Histone Deacetylase Activity is Associated with HDAC3 in Vivo. *J. Biol. Chem.* 2001;276(38):35826–35.

Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Florentini C, et al. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature.* 1997;387(6634):729–33.

Fonseca CT, Brito CF, Alves JB, Oliveira SC. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. *Vaccine* [Internet]. 2004;22(3-4):503–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670333>

Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, et al. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* [Internet]. 1990;5(9):1321–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

-G-

Gallagher ED, Gutowski S, Sternweis PC, Cobb MH. RhoA Binds to the Amino Terminus of MEKK1 and Regulates Its Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* 2004;279(3):1872–7.

Gantt SL, Gattis SG, Fierke CA. Catalytic activity and inhibition of human histone deacetylase 8 is dependent on the identity of the active site metal ion. *Biochemistry.* 2006;45(19):6170–8.

Gao J, Siddoway B, Huang Q, Xia H. Inactivation of CREB mediated gene transcription by HDAC8 bound protein phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;379(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.135>

Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 2002;277(28):25748–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948178>

Gasman S, Kalaidzidis Y, Zerial M. RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat. Cell Biol.* 2003;5(3):195–204.

Gazzinelli G, de Oliveira CC, Figueiredo EA, Pereira LH, Coelho PMZ, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: Biochemical evidence for morphogenetic change from cercaria to schistosomule. *Exp. Parasitol.* 1973;34(2):181–

8.

Gigant B, Martin-Barbey C, Curmi PA, Sobel A, Knossow M. [The stathmin-tubulin interaction and the regulation of the microtubule assembly]. *Pathol. Biol. (Paris)*. [Internet]. 2003;51(1):33–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628290>

Goode BL, Eck MJ. Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* [Internet]. 2007;76(1):593–627. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647>

Gray DJ, Ross AG, Li YS, McManus DP. Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ*. 2011.

Gregoretti I V., Lee YM, Goodson H V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 2004;338(1):17–31.

Grevelding CG, Sommer G, Kunz W. Female-specific gene expression in *Schistosoma mansoni* is regulated by pairing. *Parasitology*. 1997;115(6):635–40.

Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: Biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem. Biol.* 2002;9(1):3–16.

Gryseels B, Nkulikyinka L, Coosemans MH. Field trials of praziquantel and oxamniquine for the treatment of schistosomiasis mansoni in Burundi. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987;81(4):641–4.

-H-

Haeberlein S, Haas W. Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. 2008;657–62.

Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJJ, et al. SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells. *Cell*. 2006;126(5):941–54.

Hajji N, Wallenborg K, Vlachos P, Füllgrabe J, Hermanson O, Joseph B. Opposing effects of hMOF and SIRT1 on H4K16 acetylation and the sensitivity to the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Oncogene*. 2010;29(15):2192–204.

Hams E, Aviello G, Fallon PG. The *Schistosoma* granuloma: Friend or foe? *Front. Immunol.* 2013;4(APR).

Han J, Das B, Wei W, Van Aelst L, Mosteller RD, Khosravi-Far R, et al. Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol. Cell. Biol.* 1997;17(3):1346–53.

Hanna S, El-Sibai M. Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell. Signal.* 2013. p. 1955–61.

Härter G, Frickmann H, Zenk S, Wichmann D, Ammann B, Kern P, et al. Diagnosis of neuroschistosomiasis by antibody specificity index and semi-quantitative real-time PCR from cerebrospinal fluid and serum. *J. Med. Microbiol.* 2014;63(PART 2):309–12.

Hayashi M. Clinical studies on cerebral schistosomiasis japonica in the Philippines. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* [Internet]. 1979;26(4):287–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/117911>

He Y, Cai G, Ni Y, Li Y, Zong H, He L. Experimental Parasitology siRNA-mediated knockdown of two tyrosinase genes from *Schistosoma japonicum* cultured in vitro q. 2012;132:394–402.

Heimburg T, Chakrabarti A, Lancelot J, Marek M, Melesina J, Hauser AT, et al. Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors Targeting HDAC8 from *Schistosoma mansoni* for the Treatment of Schistosomiasis. *J. Med. Chem.* 2016;59(6):2423–35.

BIBLIOGRAPHIE

Hinz R, Schwarz NG, Hahn A, Frickmann H. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis – A review. *Mol. Cell. Probes*. 2017. p. 2–21.

Hockley DJ. Small spines on the egg shells of *Schistosoma*. *Parasitology*. 1968;58(2):367–70.

Hockley DJ, McLaren DJ. *Schistosoma mansoni*: Changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. *Int. J. Parasitol.* 1973;3(1):13–20.

Hong Y, Cao X, Han Q, Yuan C, Zhang M, Han Y, et al. Proteome-wide analysis of lysine acetylation in adult *Schistosoma japonicum* worm. *J. Proteomics*. 2016;148:202–12.

Horemans AMC, Tielens AGM, van den Bergh SG. The reversible effect of glucose on the energy metabolism of *Schistosoma mansoni* cercariae and schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992;51(1):73–9.

Howel RE, Gazzinelli G. *Schistosoma mansoni*: Mechanism of Cercarial Tail and its Significance to Host Penetration¹ the skin of the mammalian host is associated with the metamorphosis of the larvae to schistosomules. This phase of. 1974;385:373–85.

Hu E, Chen Z, Fredrickson T, Zhu Y, Kirkpatrick R, Zhang GF, et al. Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J. Biol. Chem.* 2000;275(20):15254–64.

-|-

Ihara K, Muraguchi S, Kato M, Shimizu T, Shirakawa M, Kuroda S, et al. Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* 1998;273(16):9656–66.

Ingram JR, Rafi SB, Eroy-Reveles AA, Ray M, Lambeth L, Hsieh I, et al. Investigation of the proteolytic functions of an expanded cercarial elastase gene family in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(4).

Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Oshimura M. The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2007. p. 1011–8.

Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T, Narumiya S. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.* 2001;3(1):8–14.

Ito H, Iwamoto I, Mizutani K, Morishita R, Deguchi T, Nozawa Y, et al. Possible interaction of a Rho effector, Rhotekin, with a PDZ-protein, PIST, at synapses of hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 2006;56(2):165–71.

-J-

Johnson K, D'Mello SR. p21-activated kinase-1 is necessary for depolarization-mediated neuronal survival. *J. Neurosci. Res.* 2005;79(6):809–15.

Joneson T, Bar-Sagi D. Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol. Cell. Biol.* [Internet]. 1999;19(9):5892–901.

Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK), structure, regulation, and functions. *Small GTPases*. 2014.

-K-

- Kajimoto K, Shao D, Takagi H, Maceri G, Zablocki D, Mukai H, et al. Hypotonic swelling-induced activation of PKN1 mediates cell survival in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* [Internet]. 2011;300(1):H191–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037231>
- Kannan S, Melesina J, Hauser A-T, Chakrabarti A, Heimburg T, Schmidtkunz K, et al. Discovery of inhibitors of schistosoma mansoni hdac8 by combining homology modeling, virtual screening, and in vitro validation. *J. Chem. Inf. Model.* 2014;54(10).
- Karmakar S, Zhang W, Ahmad G, Torben W, Alam MU, Le L, et al. Use of an Sm-p80-based therapeutic vaccine to kill established adult schistosome parasites in chronically infected baboons. *J. Infect. Dis.* 2014a;209(12):1929–40.
- Karmakar S, Zhang W, Ahmad G, Torben W, Alam MU, Le L, et al. Cross-species protection: Schistosoma mansoni Sm-p80 vaccine confers protection against Schistosoma haematobium in hamsters and baboons. *Vaccine.* 2014b;32(11):1296–303.
- Kasinathan RS, Sharma LK, Cunningham C, Webb TR, Greenberg RM. Inhibition or Knockdown of ABC Transporters Enhances Susceptibility of Adult and Juvenile Schistosomes to Praziquantel. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014;8(10).
- Kato K MM. Comparative examinations. *Japanese J. Parasitol.* 1954;3:35.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1972;14(6):397–400.
- Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* [Internet]. 2009;136(1):62–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2757125&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kawamoto F, Shozawa A, Kumada N, Kojima K. *Parasitolngy.* 1989;368–74.
- Keedy KS, Archin NM, Gates AT, Espeseth A, Hazuda DJ, Margolis DM. A Limited Group of Class I Histone Deacetylases Acts To Repress Human Immunodeficiency Virus Type 1 Expression. *J. Virol.* [Internet]. 2009;83(10):4749–56. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02585-08>
- Kephart GM, Andrade ZA, Gleich GJ. Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of Schistosoma mansoni in human pathologic tissue. *Am. J. Pathol.* [Internet]. 1988;133(2):389–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2461091>
- Khandelwal P, Ruiz WG, Apodaca G. Compensatory endocytosis in bladder umbrella cells occurs through an integrin-regulated and RhoA-and dynamin-dependent pathway. *EMBO J.* 2010;29(12):1961–75.
- Kim JY, Casaccia P. HDAC1 in axonal degeneration: A matter of subcellular localization. *Cell Cycle.* 2010. p. 3680–4.
- Kittur N, Castleman JD, Campbell CH, King CH, Colley DG. Comparison of schistosoma mansoni prevalence and intensity of infection, as determined by the circulating cathodic antigen urine assay or by the kato-katz fecal assay: A systematic review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016;94(3):605–10.
- Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* 1998;12(21):3331–6.
- Kjetland EF, Leutscher PDC, Ndhlovu PD. A review of female genital schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 2012. p. 58–65.

- Kohn AB, Anderson PA V, Roberts-Misterly JM, Greenberg RM. Schistosome calcium channel β subunits: Unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. *J. Biol. Chem.* 2001;276(40):36873–6.
- Koizumi K, Takano K, Kaneyasu A, Watanabe-Takano H, Tokuda E, Abe T, et al. RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. *Mol. Biol. Cell* [Internet]. 2012;23(23):4647–61. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E12-04-0315>
- Komander D, Garg R, Wan PTC, Ridley AJ, Barford D. Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I:RhoE complex structure. *EMBO J.* 2008;27(23):3175–85.
- Kuhlmann N, Wroblowski S, Knyphausen P, de Boor S, Brenig J, Zienert AY, et al. Structural and mechanistic insights into the regulation of the fundamental Rho-regulator RhoGDI α by lysine acetylation. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 2015;jbc.M115.707091. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.707091>
- Kuhlmann N, Wroblowski S, Scislowski L, Lammers M. RhoGDI α Acetylation at K127 and K141 Affects Binding toward Nonprenylated RhoA. *Biochemistry.* 2016;55(2):304–12.
- Kühn S, Geyer M. Formins as effector proteins of rho GTPases. *Small GTPases.* 2014.
- Kunz W, Gohr L, Grevelding C, Schussler P, Sommer G, Menrath M, et al. *Schistosoma mansoni*: control of female fertility by the male. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1995;90(2):185–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8531655
- Kuroda S, Fukata M, Kobayashi K, Nakafuku M, Nomura N, Iwamatsu A, et al. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J. Biol. Chem.* 1996;271(38):23363–7.
- Kusel JR, Al-Adhami BH, Doenhoff MJ. The schistosome in the mammalian host: Understanding the mechanisms of adaptation. *Parasitology.* 2007. p. 1477–526.

-L-

- Lamaze C, Chuang TH, Terlecky LJ, Bokoch GM, Schmid SL. Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature.* 1996;382(6587):177–9.
- Lammers M, Rose R, Scrima A, Wittinghofer A. The regulation of mDia1 by autoinhibition and its release by RhoGTP. *EMBO J.* 2005;24(23):4176–87.
- Lancelot J, Caby S, Dubois-Abdesselem F, Vanderstraete M, Trolet J, Oliveira G, et al. *Schistosoma mansoni* Sirtuins: Characterization and Potential as Chemotherapeutic Targets. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7(9).
- Lang P, Gesbert F. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 1996;15(3):510–9.
- Langsfeld ES, Bodily JM, Laimins LA. The Deacetylase Sirtuin 1 Regulates Human Papillomavirus Replication by Modulating Histone Acetylation and Recruitment of DNA Damage Factors NBS1 and Rad51 to Viral Genomes. *PLoS Pathog.* 2015;11(9).
- Lawton SP, Hirai H, Ironside JE, Johnston DA, Rollinson D. Genomes and geography : genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasit. Vectors* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;4(1):131. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/131>
- Lee H, Sengupta N, Villagra A, Rezai-Zadeh N, Seto E. Histone Deacetylase 8 Safeguards the Human Ever-Shorter Telomeres 1B (hEST1B) Protein from Ubiquitin-Mediated Degradation. *Mol. Cell. Biol.* [Internet]. 2006;26(14):5259–69. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01971-05>

BIBLIOGRAPHIE

Leenders F, Möpert K, Schmiedeknecht A, Santel A, Czauderna F, Aleku M, et al. PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase. *EMBO J.* 2004;23(16):3303–13.

Levy LF, Baldachin BJ, Clain D. Intracranial bilharzia. *Cent. Afr. J. Med.* [Internet]. 1975;21(4):76–84. Available from:

<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L6070152\nhttp://link.kib.ki.se/?sid=EMBASE&issn=00089176&id=doi:&atitle=Intracranial+bilharzia&stitle=CENT.+AFR.+J.+MED.&title=Central+Afrikan+Journal+of+Medicine&volume=21&issue=4&>

Li H, Wang W. Apropos: Critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil. *Infect. Dis. Poverty.* 2017.

Li J, Chen S, Cleary RA, Wang R, Gannon OJ, Seto E, et al. Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues. *AJP Cell Physiol.* [Internet]. 2014;307(3):C288–95. Available from: <http://ajpcell.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpcell.00102.2014>

Liang MP, Banatao DR, Klein TE, Brutlag DL, Altman RB. WebFEATURE: An interactive web tool for identifying and visualizing functional sites on macromolecular structures. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3324–7.

Ligeti E, Dagher MC, Hernandez SE, Koleske AJ, Settleman J. Phospholipids Can Switch the GTPase Substrate Preference of a GTPase-activating Protein. *J. Biol. Chem.* 2004;279(7):5055–8.

Lin Q, Fuji RN, Yang W, Cerione RA. RhoGDI is required for Cdc42-mediated cellular transformation. *Curr. Biol.* 2003;13(17):1469–79.

Liu CA, Wang MJ, Chi CW, Wu CW, Chen JY. Rho/Rhotekin-mediated NF-kappaB activation confers resistance to apoptosis. *Oncogene* [Internet]. 2004;23(54):8731–42.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15480428>

Lopez G, Bill KLJ, Bid HK, Braggio D, Constantino D, Prudner B, et al. HDAC8, A potential therapeutic target for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). *PLoS One.* 2015;10(7).

Lopez J V. The Global Invertebrate Genomics Alliance (GIGA): Developing Community Resources to Study Diverse Invertebrate Genomes. *J. Hered.* 2014;105(1):1–18.

Loucks FA, Le SS, Zimmermann AK, Ryan KR, Barth H, Aktories K, et al. Rho family GTPase inhibition reveals opposing effects of mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling cascades on neuronal survival. *J. Neurochem.* 2006;97(4):957–67.

Louis L, Mak TK, Phongluxa K, Ayé Soukhathammavong P, Vonghachack Y, Keiser J, et al. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mekongi* and *Opisthorchis viverrini*: A randomized, single-blinded dose-comparison trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(7).

Lwin M, Last C, Targett GAT, Doenhoff MJ. Infection of mice concurrently with *Schistosoma mansoni* and rodent malaria: contrasting effects of patent *S. mansoni* infections on *Plasmodium chabaudi*, *P. yoelii* and *P. berghei*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1982;76(3):265–73.

-M-

Mabey D. Interactions between HIV infection and other sexually transmitted diseases. *Trop. Med. Int. Health.* 2000;5(7):A32–6.

MacDonald DM, Morrison JGL. Cutaneous ectopic schistosomiasis. *Br. Med. J.* 1976;2(6036):619–20.

- MacGregor AN, Shore SJ. Immunocytochemistry of cytoskeletal proteins in adult *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 1990;20(3):279–84.
- MacHacek M, Hodgson L, Welch C, Elliott H, Pertz O, Nalbant P, et al. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature.* 2009;461(7260):99–103.
- Machado-silva JR, Lanfredi RM, Gomes DC. Morphological Study of Adult Male Worms of *Schistosoma mansoni* Sambon , 1907 by Scanning Electron Microscopy. 1997;92(5):647–53.
- Madaule P, Eda M, Watanabe N, Fujisawa K, Matsuoka T, Bito H, et al. Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature.* 1998;394(6692):491–4.
- Madaule P, Furuyashiki T, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Morii N, et al. A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett.* 1995;377(2):243–8.
- Marek M, Kannan S, Hauser AT, Moraes Mourão M, Caby S, Cura V, et al. Structural Basis for the Inhibition of Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a Key Epigenetic Player in the Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog.* 2013;9(9).
- Matozaki T, Nakanishi H, Takai Y. Small G-protein networks: Their crosstalk and signal cascades. *Cell. Signal.* 2000;12(8):515–24.
- Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 1996;15(9):2208–16.
- Meyer T, Sekljic H, Fuchs S, Bothe H, Schollmeyer D, Miculka C. Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009;3(1):3–7.
- Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR. Differential localization of Rho GTPases in live cells: Regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* 2001;152(1):111–26.
- Milia J, Teyssier F, Dalenc F, Ader I, Delmas C, Pradines A, et al. Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ.* 2005;12(5):492–501.
- Miller NLG, Kleinschmidt EG, Schlaepfer DD. RhoGEFs in Cell Motility: Novel Links Between Rgncf and Focal Adhesion Kinase. *Curr. Mol. Med.* [Internet]. 2014;14(2):221–34. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1566-5240&volume=14&issue=2&spage=221>
- Misaki K. PKN delays mitotic timing by inhibition of Cdc25C: Possible involvement of PKN in the regulation of cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2001;98(1):125–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.021541498>
- Moné H, Holtfreter MC, Allienne JF, Mintsá-Nguéma R, Ibikounlé M, Boissier J, et al. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). *Parasitol. Res.* 2015;114(11):4127–33.
- Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* 2003;13(1):13–22.
- Möpert K, Löffler K, Röder N, Kaufmann J, Santel A. Depletion of protein kinase N3 (PKN3) impairs actin and adherens junctions dynamics and attenuates endothelial cell activation. *Eur. J. Cell Biol.* 2012;91(9):694–705.
- Morais ER, Oliveira KC, De Paula RG, Ornelas AMM, Moreira ÉBC, Badoco FR, et al. Effects of proteasome inhibitor MG-132 on the parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS One.* 2017;12(9).
- Moriyama K, Iida K, Yahara I. Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes to Cells.* 1996;1(1):73–86.

BIBLIOGRAPHIE

Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2):315–29.

de Mota LS, de Almeida FC, Teixeira RDL, de Silva SF, de Mesquita LSU, Soares AM. Ectopic cutaneous schistosomiasis - Case report. *An. Bras. Dermatol.* 2014;89(4):646–8.

Mott KE, Baltes R, Bambagha J, Baldassini B. Field studies of a reusable polyamide filter for detection of *Schistosoma haematobium* eggs by urine filtration. *Tropenmed. Parasitol.* [Internet]. 1982;33(4):227–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez.statsbiblioteket.dk:2048/pubmed/7164164>

Mukai H. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *J. Biochem.* 2003. p. 17–27.

-N-

Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.* 1996;392(2):189–93.

Nakamura KI, Fujita A, Murata T, Watanabe G, Mori C, Fujita J, et al. Rho-philin, a small GTPase Rho-binding protein, is abundantly expressed in the mouse testis and localized in the principal piece of the sperm tail. *FEBS Lett.* 1999;445(1):9–13.

Narumiya S, Yasuda S. Rho GTPases in animal cell mitosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006;18(2):199–205.

Nethe M, Anthony EC, Fernandez-Borja M, Dee R, Geerts D, Hensbergen PJ, et al. Focal-adhesion targeting links caveolin-1 to a Rac1-degradation pathway. *J. Cell Sci.* [Internet]. 2010;123(11):1948–58. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.062919>

Niemann T, Marti HP, Duhnsen SH, Bongartz G. Pulmonary Schistosomiasis – Imaging Features. *J. Radiol. Case Rep.* [Internet]. 2010;4(9). Available from: <http://www.radiologycases.com/index.php/radiologycases/article/view/482>

Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 2003;5(3):236–41.

North BJ, Verdin E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* 2004;5(5):224.

Nusser N, Gosmanova E, Makarova N, Fujiwara Y, Yang L, Guo F, et al. Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: Implications to NGF-induced neurite outgrowth. *Cell. Signal.* 2006;18(5):704–14.

-O-

O. N. *Schistosoma haematobium* and *Plasmodium falciparum* co-infection with protection against *Plasmodium falciparum* malaria in Nigerian children [Internet]. *Trop. Med. Int. Heal.* 2009. p. 189. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed9&NEWS=N&AN=70252984>

Ochodo EA, Gopalakrishna G, Spek B, Reitsma JB, van Lieshout L, Polman K, et al. Circulating antigen tests and urine reagent strips for diagnosis of active schistosomiasis in endemic areas. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015.

Oger F, Dubois F, Caby S, Noël C, Cornette J, Bertin B, et al. The class I histone deacetylases of the

platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2008;377(4):1079–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.090>

Ohmae H, Sinuon M, Kirinoki M, Matsumoto J, Chigusa Y, Socheat D, et al. Schistosomiasis mekongi: From discovery to control. *Parasitol. Int.* 2004. p. 135–42.

Okabe T, Nakamura T, Nishimura YN, Kohu K, Ohwada S, Morishita Y, et al. RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the β -Catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 2003;278(11):9920–7.

Olliaro PL, Vaillant MT, Belizario VJ, Lwambo NJS, Ouldabdallahi M, Pieri OS, et al. A multicentre randomized controlled trial of the efficacy and safety of single-dose praziquantel at 40 mg/kg vs. 60 mg/kg for treating intestinal schistosomiasis in the Philippines, Mauritania, Tanzania and Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011;5(6).

Olson DE, Udeshi ND, Wolfson NA, Pitcairn CA, Sullivan ED, Jaffe JD, et al. An unbiased approach to identify endogenous substrates of “histone” deacetylase 8. *ACS Chem. Biol.* 2014;9(10):2210–6.

Olson MF, Ashworth A, Hall A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* (80-.). 1995;269(5228):1270–2.

-P-

Palazzo AF, Cook TA, Alberts AS, Gundersen GG. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* 2001;3(8):723–9.

Pandey D, Goyal P, Bamburg JR, Siess W. Regulation of LIM-kinase 1 and cofilin in thrombin-stimulated platelets. *Blood.* 2006;107(2):575–83.

Paul F, Zauber H, von Berg L, Rocks O, Daumke O, Selbach M. Quantitative GTPase Affinity Purification Identifies Rho Family Protein Interaction Partners. *Mol. Cell. Proteomics* [Internet]. 2017;16(1):73–85. Available from: <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M116.061531>

Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* [Internet]. 2002;2(7):499–511. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri843>

Peck JW, Oberst M, Bouker KB, Bowden E, Burbelo PD. The RhoA-binding protein, rhopilin-2, regulates actin cytoskeleton organization. *J. Biol. Chem.* 2002;277(46):43924–32.

Pérez del Villar L, Burguillo FJ, López-Abán J, Muro A. Systematic Review and Meta-Analysis of Artemisinin Based Therapies for the Treatment and Prevention of Schistosomiasis. *PLoS One.* 2012;7(9).

Pervaiz S, Cao J, Chao OS, Chin YY, Clément M V. Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells. *Oncogene* [Internet]. 2001;20(43):6263–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11593437>

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

Pinner S, Sahai E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat. Cell Biol.* 2008;10(2):127–37.

Prah SK, James C. The influence of physical factors on the survival and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* I. Effect of temperature and ultra-violet light *. *INIST CNRS*; 1977;(May 2018).

-Q-

Qi J, Singh S, Hua WK, Cai Q, Chao SW, Li L, et al. HDAC8 Inhibition Specifically Targets Inv(16) Acute Myeloid Leukemic Stem Cells by Restoring p53 Acetylation. *Cell Stem Cell*. 2015;17(5):597–610.

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(9).

-R-

Ramalho-Pinto FJ, Gazzinelli G, Howells RE, Mota-Santos TA, Figueiredo EA, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: Defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. *Exp. Parasitol*. 1974;36(3):360–72.

Redon CE, Weyemi U, Parekh PR, Huang D, Burrell AS, Bonner WM. γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech*. 2012;1819(7):743–56.

Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, et al. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the Rho-binding domain. *J. Biol. Chem*. 1996;271(23):13556–60.

Reiner C, Nathanson NM. The internalization of the M2 and M4 muscarinic acetylcholine receptors involves distinct subsets of small G-proteins. *Life Sci*. 2008;82(13-14):718–27.

Ren XD, Schwartz M a. Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol*. 2000;325(1991):264–72.

Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ, Luger K, Ma AW. Crystal structure of the nucleosome ° resolution core particle at 2 . 8 Å. 1997;7.

Ridley AJ. Stress fibres take shape. *Nat. Cell Biol*. 1999;1(3):E64–6.

Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol. Cell. Biol*. [Internet]. 2003;23(12):4219–29.

Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=156133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Rolli-Derkinderen M. Phosphorylation of Serine 188 Protects RhoA from Ubiquitin/Proteasome-Mediated Degradation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res*. [Internet]. 2005;96(11):1152–60. Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.RES.0000170084.88780.ea>

Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, Carlier MF. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*. 2004;119(3):419–29.

Roof RW, Haskell MD, Dukes BD, Sherman N, Kinter M, Parsons SJ. Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol. Cell. Biol*. 1998;18(12):7052–63.

Ross AG, McManus DP, Farrar J, Hunstman RJ, Gray DJ, Li YS. Neuroschistosomiasis. *J. Neurol*. 2012. p. 22–32.

Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect. Dis*. 2007. p. 218–24.

Rothbart SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 2014. p. 627–43.

-S-

Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: Chemotherapy of infections of different ages. *Exp. Parasitol.* 1986;61(3):294–303.

Saeed MEM, Krishna S, Greten HJ, Kreamsner PG, Efferth T. Antischistosomal activity of artemisinin derivatives in vivo and in patients. *Pharmacol. Res.* 2016. p. 216–26.

Salter JP, Lim KC, Hansell E, Hsieh I, McKerrow JH. Schistosome invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *J. Biol. Chem.* 2000;275(49):38667–73.

Sander EE, Ten Klooster JP, Van Delft S, Van Der Kammen RA, Collard JG. Rac downregulates Rho activity: Reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* 1999;147(5):1009–21.

Santini-Oliveira M, Coler RN, Parra J, Veloso V, Jayashankar L, Pinto PM, et al. Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. *Vaccine.* 2015;34(4):586–94.

Santos TM, Machado CR, Franco GR, Pena SDJ. Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* [Internet]. 2002;125(1-2):103–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685102002189>

Schaefer A, Reinhard NR, Hordijk PL. Toward understanding RhoGTPase specificity: Structure, function and local activation. *Small GTPases.* 2014;5(2).

Scheffler JM, Schiefermeier N, Huber LA. Mild fixation and permeabilization protocol for preserving structures of endosomes, focal adhesions, and actin filaments during immunofluorescence analysis. *Methods Enzymol.* 2014;535:93–102.

Schmidt A, Durgan J, Magalhaes A, Hall A. Rho GTPases regulate PRK2/PKN2 to control entry into mitosis and exit from cytokinesis. *EMBO J.* 2007;26(6):1624–36.

Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 2002a;16(13):1587–609.

Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gln 63 of Rho is deamidated by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature.* 1997;387(6634):725–9.

Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J. Cell Biol.* 2002;158(4):647–57.

Sells MA, Boyd JT, Chernoff J. p21-Activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J. Cell Biol.* 1999;145(4):837–49.

Settleman J. A nuclear MAL-function links Rho to SRF. *Mol. Cell.* 2003;11(5):1121–3.

Shen DW, Pouliot LM, Gillet JP, Ma W, Johnson AC, Hall MD, et al. The transcription factor GCF2 is an upstream repressor of the small GTPase RhoA, regulating membrane protein trafficking, sensitivity to doxorubicin, and resistance to cisplatin. *Mol. Pharm.* 2012;9(6):1822–33.

BIBLIOGRAPHIE

Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2005;280(14):13560–7.

Siddiqui AA, Zhou Y, Podesta RB, Karcz SR, Tognon CE, Strejan GH, et al. Characterization of Ca²⁺-dependent neutral protease (calpain) from human blood flukes, *Schistosoma mansoni*. *BBA - Mol. Basis Dis.* 1993;1181(1):37–44.

Singh NK, Kundumani-Sridharan V, Kumar S, Verma SK, Kotla S, Mukai H, et al. Protein kinase N1 is a novel substrate of NFATc1-mediated cyclin D1-CDK6 activity and modulates vascular smooth muscle cell division and migration leading to inward blood vessel wall remodeling. *J. Biol. Chem.* 2012;287(43):36291–304.

Singh US, Kunar MT, Kao YL, Baker KM. Role of transglutaminase II in retinoic acid-induced activation of RhoA-associated kinase-2. *EMBO J.* 2001;20(10):2413–23.

Skelly PJ, Alan Wilson R. Making Sense of the Schistosome Surface. *Adv. Parasitol.* 2006. p. 185–284.

Smith C, Smith H, Seaton R a, Fox R. Seroprevalence of schistosomiasis in African patients infected with HIV. *HIV Med.* 2008;9:436–9.

Snyder JT, Worthylake DK, Rossman KL, Betts L, Pruitt WM, Siderovski DP, et al. Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat. Struct. Biol.* [Internet]. 2002a;9(6):468–75. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsb796>

Snyder JT, Worthylake DK, Rossman KL, Betts L, Pruitt WM, Siderovski DP, et al. Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat. Struct. Biol.* 2002b;9(6):468–75.

Standaert M, Bandyopadhyay G, Galloway L, Ono Y, Mukai H, Farese R. Comparative effects of GTPγS and insulin on the activation of Rho, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase N in Rat adipocytes. Relationship to glucose transport. *J. Biol. Chem.* 1998;273(13):7470–7.

Stenger RJ, Warren KS, Johnson EA. An ultrastructural study of hepatic granulomas and schistosome egg shells in murine hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Exp. Mol. Pathol.* 1967;7(1):116–32.

Steuve S, Devosse T, Lauwers E, Vanderwinden JM, André B, Courtoy PJ, et al. Rophilin-2 is targeted to late-endosomal structures of the vesicular machinery in the presence of activated RhoB. *Exp. Cell Res.* 2006;312(20):3981–9.

Stirewalt MA, Cousin CE, Dorsey CH. *Schistosoma mansoni*: Stimulus and transformation of cercariae into schistosomules. *Exp. Parasitol.* 1983;56(3):358–68.

Stockhausen M-T, Sjö Lund J, Manetopoulos C, Axelson H. Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on Notch signalling in human neuroblastoma cells. *Br. J. Cancer.* 2005;92:751–9.

Stolfa DA, Marek M, Lancelot J, Hauser AT, Walter A, Leproult E, et al. Molecular basis for the antiparasitic activity of a mercaptoacetamide derivative that inhibits histone deacetylase 8 (HDAC8) from the human pathogen *Schistosoma mansoni*. *J. Mol. Biol.* 2014;426(20):3442–53.

Strahl b. d, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* [Internet]. 2000;403(January):41. Available from: <http://www.nature.com/nature/journal/v403/n6765/pdf/403041a0.pdf>

-T-

Taft AS, Norante FA, Yoshino TP. *NIH Public Access.* 2011;125(2):84–94.

Takahashi M, Mukai H, Toshimori M, Miyamoto M, Ono Y. Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95(20):11566–71.

BIBLIOGRAPHIE

- Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p. *Science* (80-). [Internet]. 1996;272(5260):408–11.
Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.272.5260.408>
- Tebeje BM, Harvie M, You H, Loukas A, McManus DP. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasites and Vectors*. 2016. p. 1–15.
- Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, et al. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 1996a;93(1):269–73.
Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40220&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, et al. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996b;93(1):269–73.
- Teramoto H, Coso OA, Miyata H, Igishi T, Miki T, Silvio Gutkind J. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c- Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway: A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J. Biol. Chem.* 1996;271(44):27225–8.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673–80.
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308517/pdf/nar00046-0131.pdf>
- Thumkeo D, Keel J, Ishizaki T, Hirose M, Nonomura K, Oshima H, et al. Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol. Cell. Biol.* [Internet]. 2003;23(14):5043–55.
Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=162229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Thumkeo D, Watanabe S, Narumiya S. Physiological roles of rho and rho effectors in mammals. *Eur. J. Cell Biol.* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2013;92(10-11):303–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.09.002>
- Tominaga T, Sahai E, Chardin P, McCormick F, Courtneidge SA, Alberts AS. Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Mol. Cell.* 2000;5(1):13–25.
- Torbett NE, Casamassima A, Parker PJ. Hyperosmotic-induced protein kinase N 1 activation in a vesicular compartment is dependent upon Rac1 and 3-phosphoinositide-dependent kinase 1. *J. Biol. Chem.* 2003;278(34):32344–51.
- Tsai S-C, Seto E. Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* [Internet]. 2002;277(35):31826–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082111>
- Tu S, Wu WJ, Wang J, Cerione RA. Epidermal growth factor-dependent regulation of Cdc42 is mediated by the Src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 2003;278(49):49293–300.

-U-

Ueda T, Kikuchi A, Ohga N, Yamamoto J, Takai Y. Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1990;265(16):9373–80.

Utzinger J, Shuhua X, N'Goran EK, Bergquist R, Tanner M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 2001. p. 1549–62.

-V-

Valderrama F, Cordeiro J V., Schleich S, Frischknecht F, Way M. Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science* (80-.). 2006;311(5759):377–81.

Vannini A, Volpari C, Filocamo G, Casavola EC, Brunetti M, Renzoni D, et al. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004;101(42):15064–9.

Vaquero A, Sternglanz R, Reinberg D. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene.* 2007. p. 5505–20.

Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 2008;582(14):2093–101.

Vermeire JJ, Osman A, LoVerde PT, Williams DL. Characterisation of a Rho homologue of *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.* 2003;33(7):721–31.

Villagra A, Cheng F, Wang H-W, Suarez I, Glozak M, Maurin M, et al. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat. Immunol.* [Internet]. 2009;10(1):92–100. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.1673>

Vögler O, Krummnerl P, Schmidt M, Jakobs KH, Van Koppen CJ. RhoA-sensitive trafficking of muscarinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* [Internet]. 1999;288(1):36–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862750>

-W-

Wallace SW, Magalhaes A, Hall A. The Rho Target PRK2 Regulates Apical Junction Formation in Human Bronchial Epithelial Cells. *Mol. Cell. Biol.* [Internet]. 2011;31(1):81–91. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01001-10>

Wallar BJ, DeWard AD, Resau JH, Alberts AS. RhoB and the mammalian Diaphanous-related formin mDia2 in endosome trafficking. *Exp. Cell Res.* 2007;313(3):560–71.

Waltregny D, Glénisson W, Tran SL, North BJ, Verdin E, Colige A, et al. Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *FASEB J.* [Internet]. 2005;19(8):966–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772115>

Wang DA, Sebti SM. Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities. *J. Biol. Chem.* 2005;280(19):19243–9.

Wang HR, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi AA, Alexandrova E, Thomsen GH, et al. Regulation of Cell Polarity and Protrusion Formation by Targeting RhoA for Degradation. *Science* . 2003;302(5651):1775–9.

Wang Y, Zheng XR, Riddick N, Bryden M, Baur W, Zhang X, et al. ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 2009;104(4):531–40.

Wang ZY, Qin W, Yi F. Targeting histone deacetylases: Perspectives for epigenetic-based therapy in cardio-cerebrovascular disease. *J. Geriatr. Cardiol.* 2015. p. 153–64.

BIBLIOGRAPHIE

- Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, et al. The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J. Cell Biol.* 2002;157(2):291–302.
- Waters SB, Yamauchi K, Pessin JE. Insulin-stimulated disassociation of the SOS-Grb2 complex. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(5):2791–9.
- Weinert BT, Wagner S a, Horn H, Henriksen P, Liu WR, Olsen J V, et al. Proteome-wide mapping of the *Drosophila* acetylome demonstrates a high degree of conservation of lysine acetylation. *Sci. Signal.* [Internet]. 2011;4(183):ra48.
Available from:
[http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans\n4/183/ra48\npapers2://publication/doi/10.1126/scisignal.2001902](http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sigtrans/n4/183/ra48\npapers2://publication/doi/10.1126/scisignal.2001902)
- Wen Y, Eng CH, Schmoranzler J, Cabrera-Poch N, Morris EJS, Chen M, et al. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* 2004;6(9):820–30.
- Wennerberg K. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J. Cell Sci.* [Internet]. 2004;117(8):1301–12. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.01118>
- Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* 2004;301(1):43–9.
- Wherlock M, Gampel A, Futter C, Mellor H. Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J. Cell Sci.* 2004;117:3221–31.
- Whitehead I, Kirk H, Togon C, Trigo-Gonzalez G, Kay R. Expression cloning of lfc, a novel oncogene with structural similarities to guanine nucleotide exchange factors and to the regulatory region of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1995;270(31):18388–95.
- Whitehead IP, Lambert QT, Glaven JA, Abe K, Rossman KL, Mahon GM, et al. Dependence of Dbl and Dbs transformation on MEK and NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 1999;19(11):7759–70.
- Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard GD, Grevelding C, et al. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009;3(4).
- Wiest PM, Tartakoff AM, Aikawa M, Mahmoud AA. Inhibition of surface membrane maturation in schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 1988;85(11):3825–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3375243\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC280312>
- Williams CL. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: A regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell. Signal.* 2003;15(12):1071–80.
- Wilson BJ, Tremblay AM, Deblois G, Sylvain-Drolet G, Giguère V. An Acetylation Switch Modulates the Transcriptional Activity of Estrogen-Related Receptor α . *Mol. Endocrinol.* [Internet]. 2010;24(7):1349–58. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/me.2009-0441>
- Wilson S, Jones FM, Mwatha JK, Kimani G, Booth M, Kariuki HC, et al. Hepatosplenomegaly associated with chronic malaria exposure: Evidence for a pro-inflammatory mechanism exacerbated by schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2009;31(2):64–71.
- Wolfson NA, Ann Pitcairn C, Fierke CA. HDAC8 substrates: Histones and beyond. *Biopolymers.* 2013. p. 112–26.
- Wu J, Du C, Lv Z, Ding C, Cheng J, Xie H, et al. The up-regulation of histone deacetylase 8 promotes proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 2013;58(12):3545–53.
- Van den Wyngaert I, de Vries W, Kremer A, Neefs J-M, Verhasselt P, Luyten WHML, et al. Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *FEBS Lett.* 2000;478:77–83.

-X-

Xu D, Curtis J, Feng Z, Minchella DJ. On the role of schistosome mating structure in the maintenance of drug-resistant strains. *Bull. Math. Biol.* 2006;68(2):209–29.

Xu YZ, Dresden MH. The hatching of schistosome eggs. *Exp. Parasitol.* 1990. p. 236–40.

-Y-

Yamana N, Arakawa Y, Nishino T, Kurokawa K, Tanji M, Itoh RE, et al. The Rho-mDia1 Pathway Regulates Cell Polarity and Focal Adhesion Turnover in Migrating Cells through Mobilizing Apc and c-Src. *Mol. Cell. Biol.* [Internet]. 2006;26(18):6844–58. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00283-06>

Yamashiro S. Citron Kinase, a Rho-dependent Kinase, Induces Di-phosphorylation of Regulatory Light Chain of Myosin II. *Mol. Biol. Cell* [Internet]. 2003;14(5):1745–56. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E02-07-0427>

Yang H, Bi Y, Xue L, Wang J, Lu Y, Zhang Z, et al. Multifaceted Modulation of SIRT1 in Cancer and Inflammation. *Crit. Rev. Oncog.* [Internet]. 2015;20(1-2):49–64. Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/439f422d0783386a,1dc3cf1839473109,54feb7027bd64321.html>

Yang XJ, Kim GW, Gocevski G, Wu CJ. Dietary, metabolic, and potentially environmental modulation of the lysine acetylation machinery. *Int. J. Cell Biol.* 2010.

Yang XJ, Seto E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: From bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. p. 206–18.

Yasuda S, Ocegüera-Yanez F, Kato T, Okamoto M, Yonemura S, Terada Y, et al. Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature.* 2004;428(6984):767–71.

Yoneda A, Multhaupt HAB, Couchman JR. The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J. Cell Biol.* 2005;170(3):443–53.

Yoshino TP, Bickham U, Bayne CJ. Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines. *Can. J. Zool.* [Internet]. 2013;91(6):391–404.

Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3816639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Young KG, Copeland JW. Formins in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2010. p. 183–90.

-Z-

Zalcman G, Closson V, Camonis J, Honoré N, Rousseau-Merck MF, Tavitian A, et al. RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI): Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J. Biol. Chem.* 1996;271(48):30366–74.

Zaoui K, Honoré S, Isnardon D, Braguer D, Badache A. Memo - RhoA - mDia1 signaling controls microtubules, the actin network, and adhesion site formation in migrating cells. *J. Cell Biol.* 2008;183(3):401–8.

Zhao J, Mialki RK, Wei J, Coon TA, Zou C, Chen BB, et al. SCF E3 ligase F-box protein complex SCFFBXL19 regulates cell migration by mediating Rac1 ubiquitination and degradation. *FASEB J.* 2013;27(7):2611–9.

Zheng Y, Fischer DJ, Santos MF, Tigyi G, Pasteris NG, Gorsk JL, et al. The faciogenital dysplasia gene product

BIBLIOGRAPHIE

FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 1996;271(52):33169–72.

Zondag GCM, Evers EE, Ten Klooster JP, Janssen L, Van Der Kammen RA, Collard JG. Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 2000;149(4):775–81.