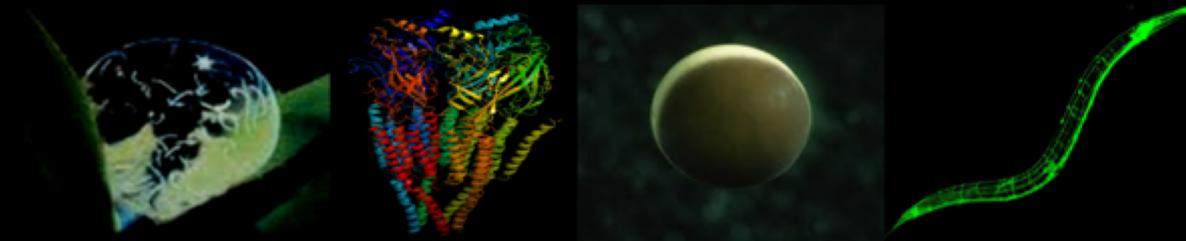


# Nouvelles approches pour le contrôle des parasites résistants aux vermifuges



Equipe Multirésistances et pouvoir pathogène des nématodes, UMR 1282 ISP  
Cédric Neveu (cedric.neveu@inra.fr)



Carrefours de l'innovation  
agronomique

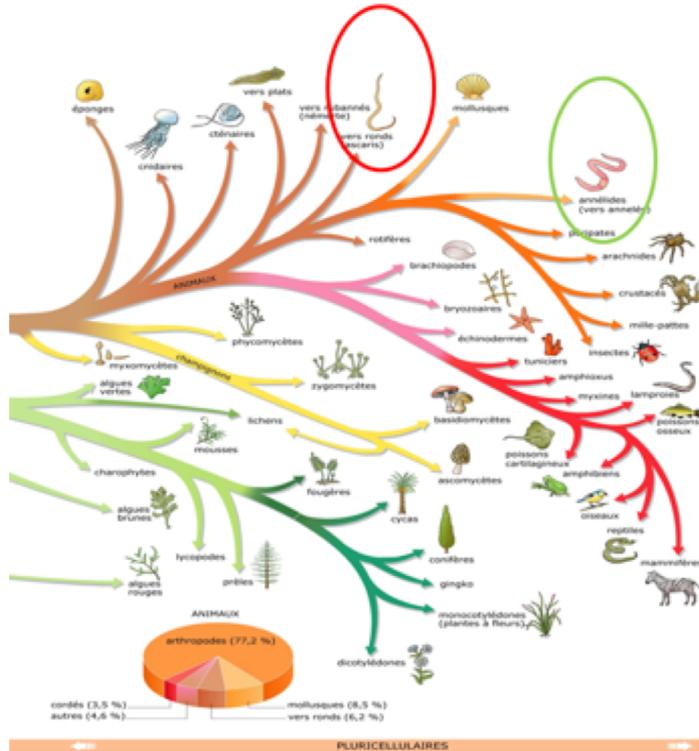


## Prévenir et guérir les maladies infectieuses dans le concept One Health



21 juin 2018 | Lycée Descartes | Tours

# Les nématodes



**Nématodes ≠ Vers de terre**

**plusieurs millions d'années de divergence !**

➤ 4/5 des animaux sur terre sont des nématodes

➤ On estime que dans 1cm<sup>3</sup> de sol :

1-5 km d'hyphe de champignon

10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> bactéries

10-60000 protozoaires

**50-100 nématodes**

<1 collembole

<1 acarien

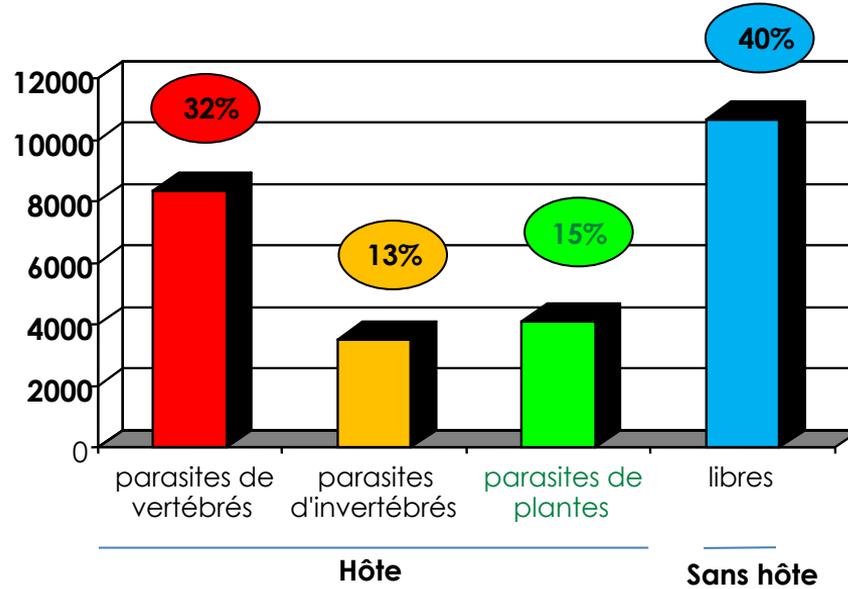


➤ **Taille :**

Généralement microscopiques : 1/10 de millimètres

...jusqu'à 7m pour un parasite de baleine

# Mode de vie des nématodes



**Moitié libres (sol, eau).....moitié parasites**

# Impact des nématodes parasites

## en santé humaine

*Enterobius vermicularis* (O.F.)



*Ascaris lumbricoides* (O.F.)

350 millions atteintes graves,  
60 000 décès annuels (OMS)



*Onchocerca volvulus* (vecteur)



*Brugia malayi* (vecteur)



## en santé animale

### Les nématodes parasites gastro-intestinaux



Pertes économiques liées :

- 1) baisses de productions ( lait, viande, laine)
- 2) Coût des traitements

**La lutte contre les nématodes est essentiellement basée sur l'utilisation d'anthelminthiques (« vermifuges »)**

# Les ANTHELMINTHIQUES (vermifuges)

Trois principales familles de molécules anthelminthiques



Benzimidazoles



Lactones macrocycliques  
Ivermectine



Agonistes cholinergiques  
Levamisole, pyrantel, Morantel



# **L'usage massif des anthelmithiques a inévitablement conduit à l'émergence de parasites résistants !**

Dans les élevages:

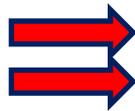
la résistance est présente à des degrés divers mais contre toutes les molécules disponibles sur le marché !

Exemple des benzimidazoles

Cas critique des multirésistances: un nombre restreint de molécules disponibles...

**Actuellement, pas d'alternative économiquement viable:  
De rares vaccins existent mais peu efficaces, trop chers, trop spécifiques, trop contraignants pour les  
éleveurs.....**

L'utilisation raisonnée des antiparasitaires disponibles:

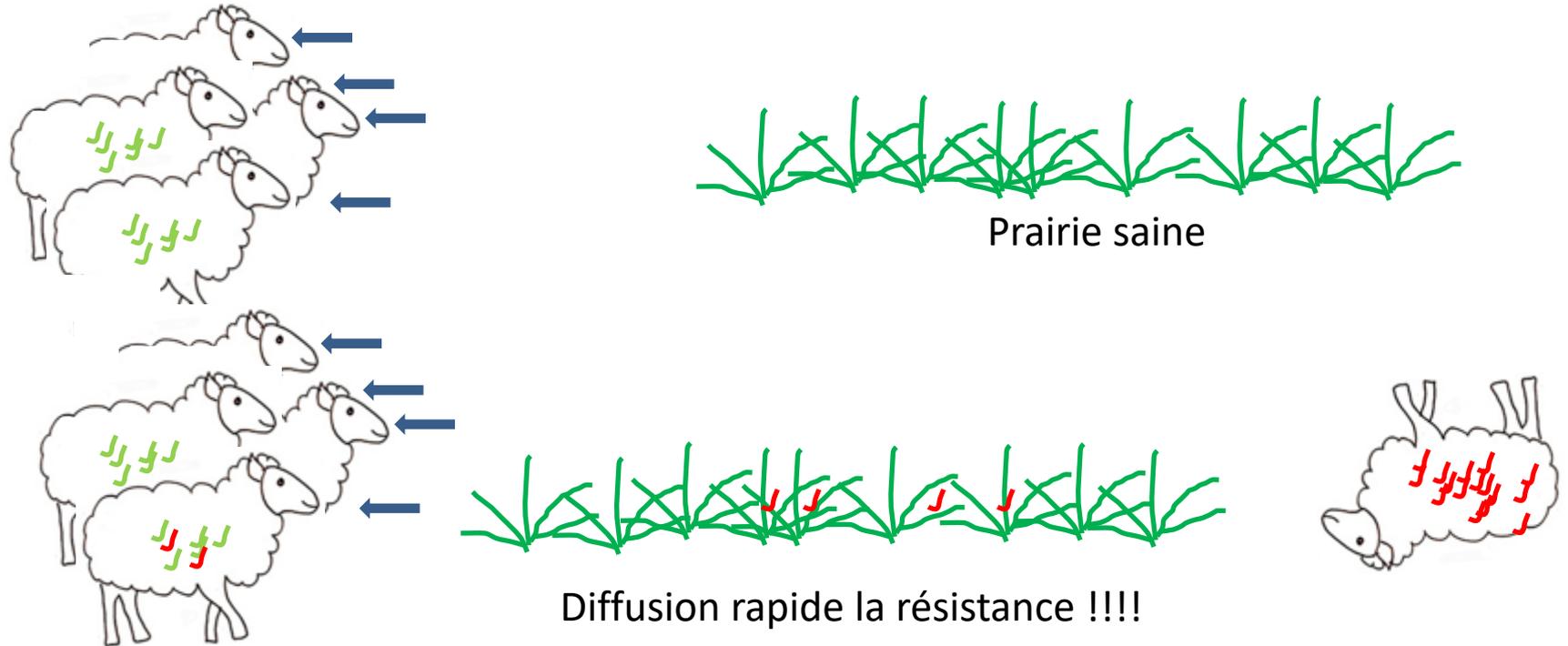


**Une réponse à la demande sociétale**

**Une nécessité absolue pour les éleveurs !!!!**

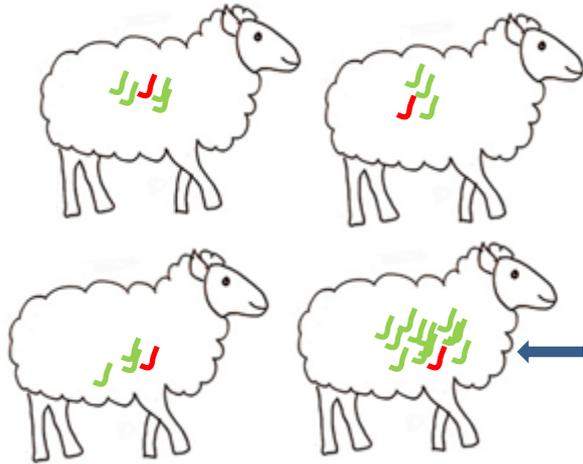
# Optimiser les pratiques d'élevage dans un contexte de résistance

Quand les antiparasitaires étaient efficaces...réduction maximale de la charge parasitaire



# Dans un contexte de résistance....

**Objectif: maintenir des allèles de susceptibilité dans les populations parasites**



Coprosopies pour identifier les animaux les plus infestés  
➡ Traitement ciblé avec une molécule encore efficace...



Prairie contaminée

Nécessite une acceptation des baisses de productions...il est indispensable de prolonger l'efficacité des molécules actuelles et à venir ...

# Pour optimiser l'usage des anthelminthiques dans un contexte de résistance



Elucider le mode d'action des anthelminthiques  
**identification des cibles pharmacologiques chez les nématodes parasites**



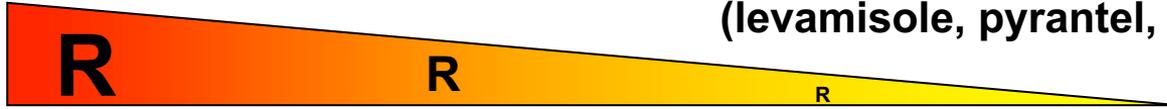
Identifier les mécanismes moléculaires impliqués  
dans l'acquisition de la résistance  
**diagnostiquer précocement la résistance,**  
**optimiser l'usage des molécules disponibles**

Identifier de nouvelles cibles pour le développement  
de nouveaux anthelminthiques (synthèse ou naturels)

# Les agonistes cholinergiques

Benzimidazoles, Ivermectines,

Agonistes cholinergiques  
(levamisole, pyrantel, morantel)



**Les agonistes cholinergiques restent efficaces  
pour contrôler les populations de nématodes BZ-R et IVM-R**

➔ **Identification des cibles moléculaires et des mécanismes  
impliqués dans la résistance chez *Haemonchus contortus*  
(espèce cosmopolite, la plus pathogène chez les petits ruminants)**

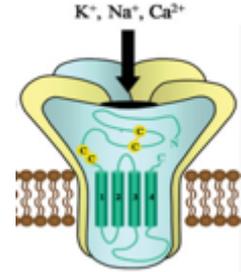
# Cibles des agonistes cholinergiques

(Levamisole, Pyrantel, Morantel....)

## Récepteurs à l'acétylcholine: AChRs

Canaux ioniques (ligand-dépendant)

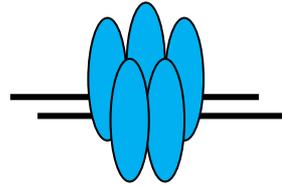
Impliqués dans les neurotransmissions synaptiques



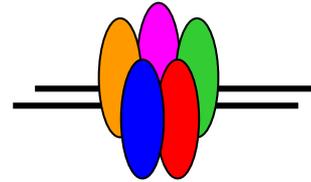
Les agonistes cholinergiques induisent une activation permanente des récepteurs localisés au niveau des jonctions neuro-musculaires

 Paralyse du nématode

Constitués de 5 sous-unités

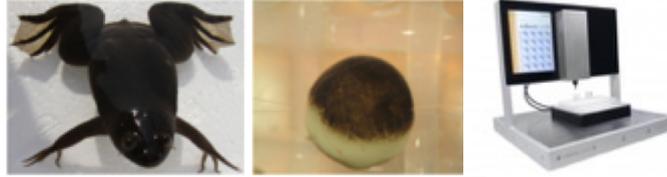


Homopentamère



Hétéropentamère

# Pour déterminer la composition en sous-unités du (ou des) récepteur(s) à l'anthelminthique d'intérêt



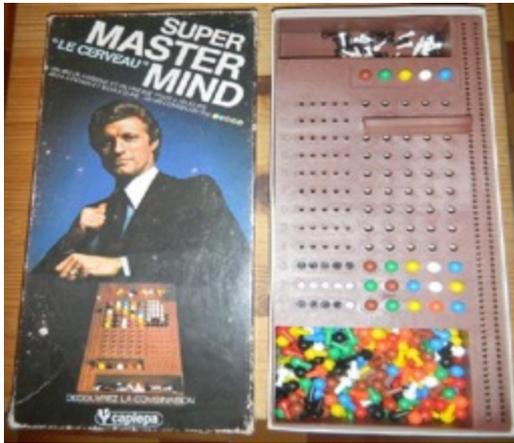
**L'œuf de Xénope:  
un système d'expression hétérologue  
pour les AChRs de nématodes**

## **Etudes électrophysiologiques**

**Déterminer les propriétés pharmacologiques  
des récepteurs (sensibilité à différents  
agonistes cholinergiques)**

# Grande diversité de sous-unités d'AChR chez les Nématodes

Chez *H. contortus*, 30 sous-unités différentes  
Une diversité potentielle d'AChR énorme !



Tester des combinaisons aléatoires  
de sous-unités est inenvisageable

Avec 30 couleurs différentes !!!!!

## Les données de l'espèce modèle *C.elegans*



*Caenorhabditis elegans*

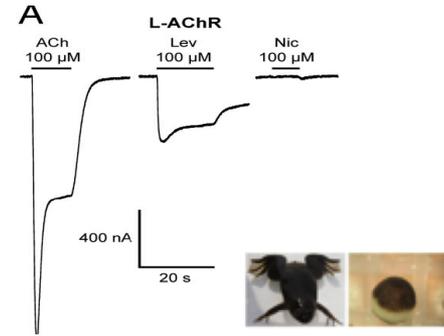
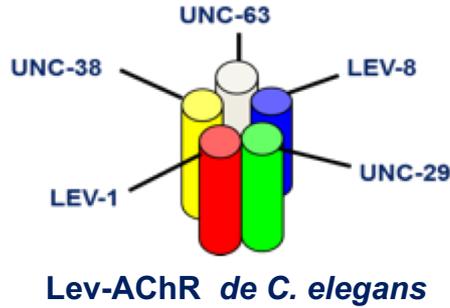
***C. elegans* est sensible aux anthelminthiques**

**Générer des mutants résistants aux anthelminthiques  
pour identifier les gènes impliqués dans la synthèse de  
leurs récepteurs**

# Criblage de mutants résistants au Lev



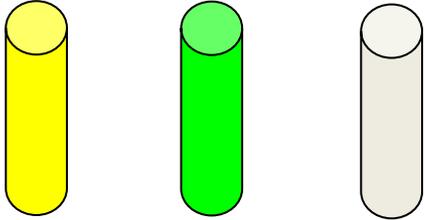
*lev-1* nAChR subunit  
*lev-8* nAChR subunit  
*unc-29* nAChR subunit  
*unc-38* nAChR subunit  
*unc-63* nAChR subunit



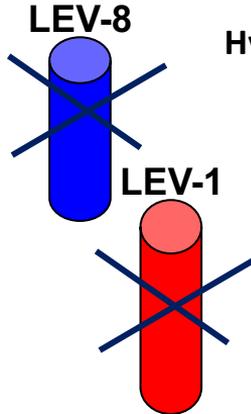
Boulin *et al.* 2008

## Transposition aux espèces parasites ?

UNC-38    UNC-29    UNC-63



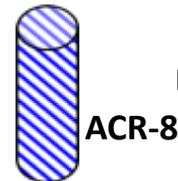
Homologues de ces sous-unités  
chez tous les nématodes



Absentes chez une majorité des espèces parasites  
sensibles au levamisole !

Hypothèse: chez les parasites, une ou plusieurs autres sous-unités  
impliquées dans la composition du récepteur au levamisole ?

**Analyse différentielle des transcriptomes  
d'isolats LEV-S et LEV-R d'*H. contortus*  
Identification d'un candidat potentiel**

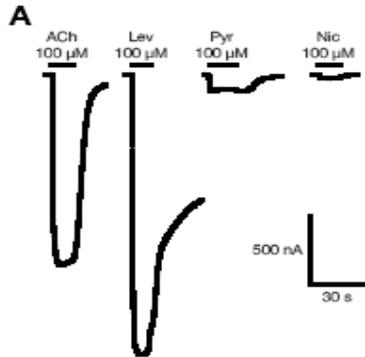
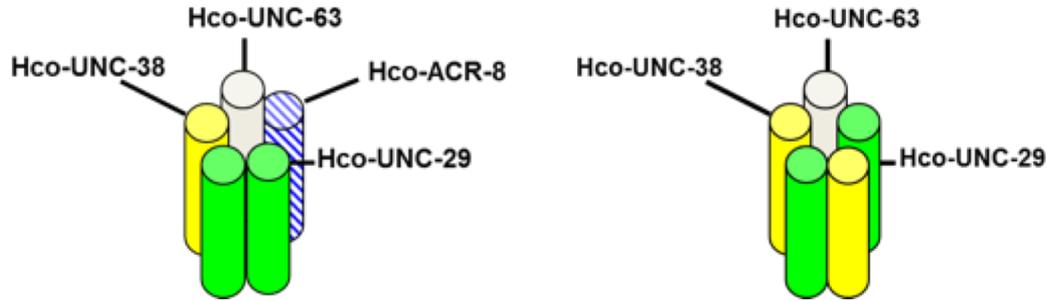


Le plus proche homologue de LEV-8  
Présent chez tous les parasites sensibles au levamisole

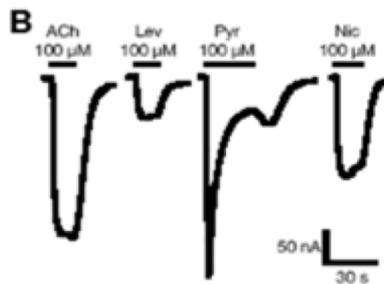


# Les récepteurs recombinants d'*H. contortus*

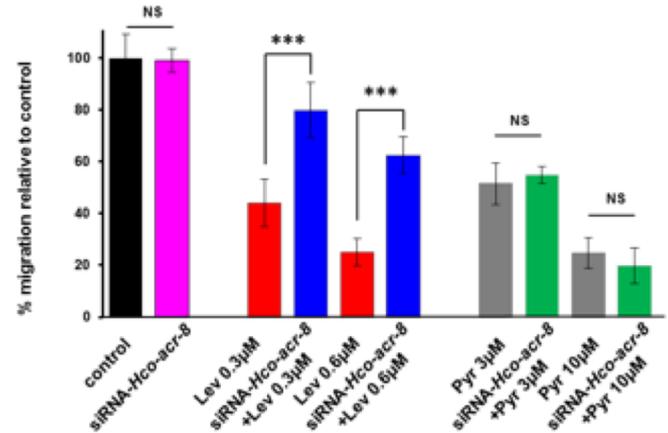
*H. contortus*



Boulin *et al.* 2011



## Inhibition de l'expression d'ACR-8 chez *H. contortus* (ARN interférence)



Blanchard *et al.* 2018

**Perte de sensibilité au Levamisole  
mais pas d'impact sur la sensibilité au Pyrantel**  
Ces 2 molécules activent préférentiellement  
des récepteurs distincts chez le parasite

# Recherche de polymorphimes associés à la résistance au Lévamisole

*Chez des isolats d'*H. contortus* (sensibles / résistants) analyse des séquences et de l'expression des différentes sous-unités du L-AChR :*

→ *Toutes les sous-unités sont exprimées chez les S et les R*

→ *Comparaison des séquences : pas de polymorphisme potentiellement associé à la résistance*

→ *Des formes tronquées de certaines sous-unités sont spécifiquement exprimées chez les isolats résistants*

ACR-8



S  
R

ACR-8  
truncated



R et R++

Fauvin *et al.* 2009

UNC-63



S  
R

UNC-63  
truncated

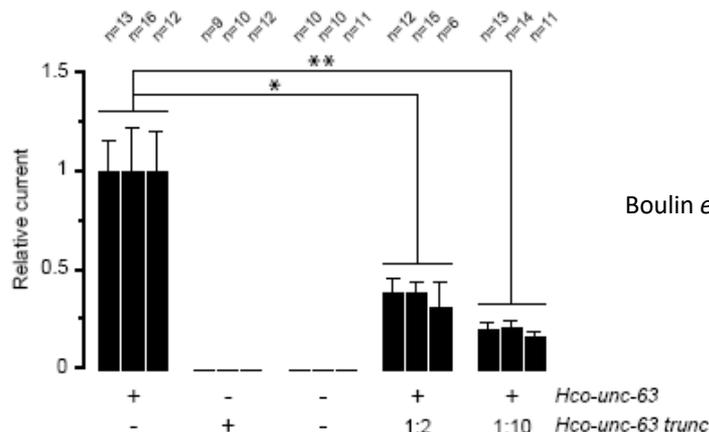
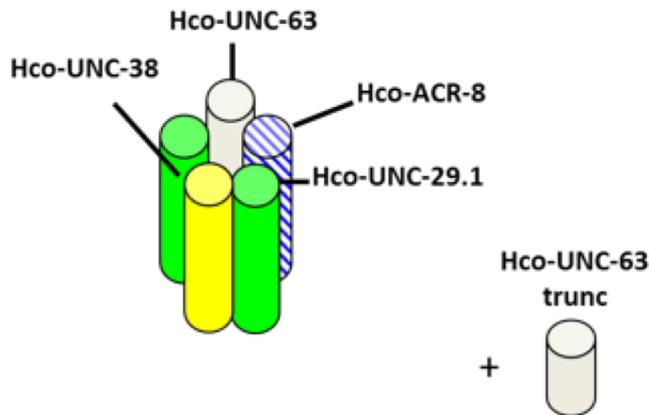


R++

Neveu *et al.* 2010



# Implication des formes tronquées d'AChR dans la résistance au Levamisole



Boulin *et al.* 2011

Effet dominant négatif sur l'expression du récepteur au Levamisole d'*H. contortus*

La perte de cibles est un mécanisme classique de résistance aux xénobiotiques



Première validation d'un mécanisme moléculaire de résistance au Lévisole chez les nématodes parasites

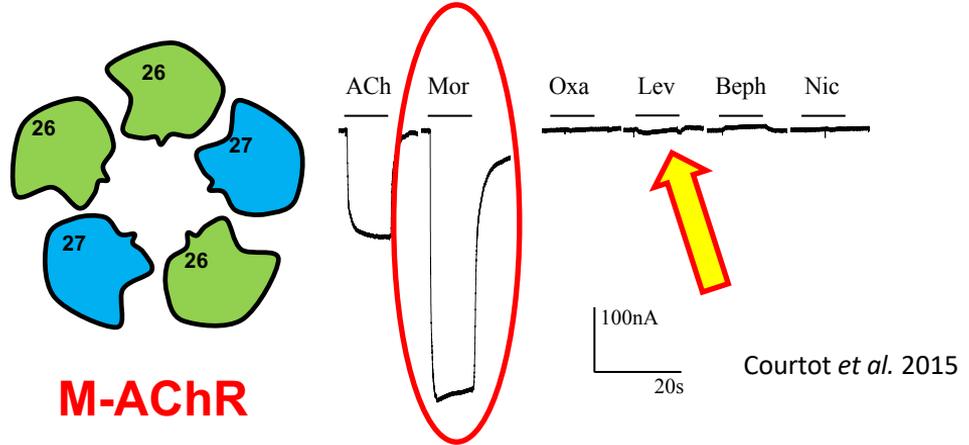
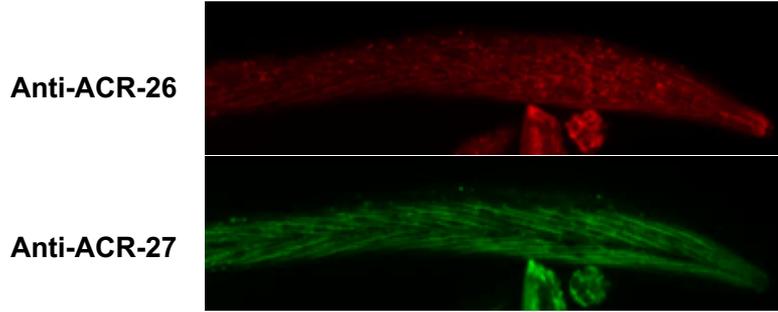
## Les hypothèses

Pour les résistants « simple dose » ACR-8 trunc  
Le Pyrantele peut encore être efficace  
(en cours d'évaluation)

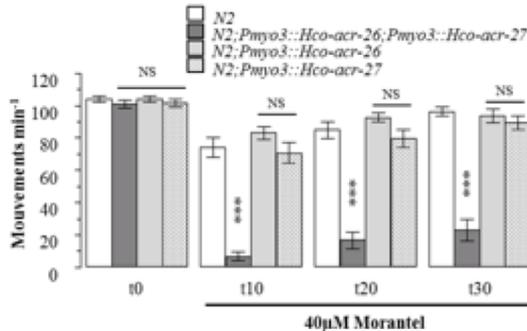
Pour les résistants « double doses » UNC-63 trunc  
Résistance croisée Lev-Pyr que l'on pouvait anticiper à partir de ces résultats confirmée sur des isolats du terrain ou sélectionnés artificiellement...

# Un nouvel espoir pour le contrôle des parasites résistants au Lev/Pyr !

Un nouveau sous-type d'AChR musculaire spécifique des nématodes parasites d'animaux (absent chez les espèces libres (*C. elegans*) et les parasites de plantes).

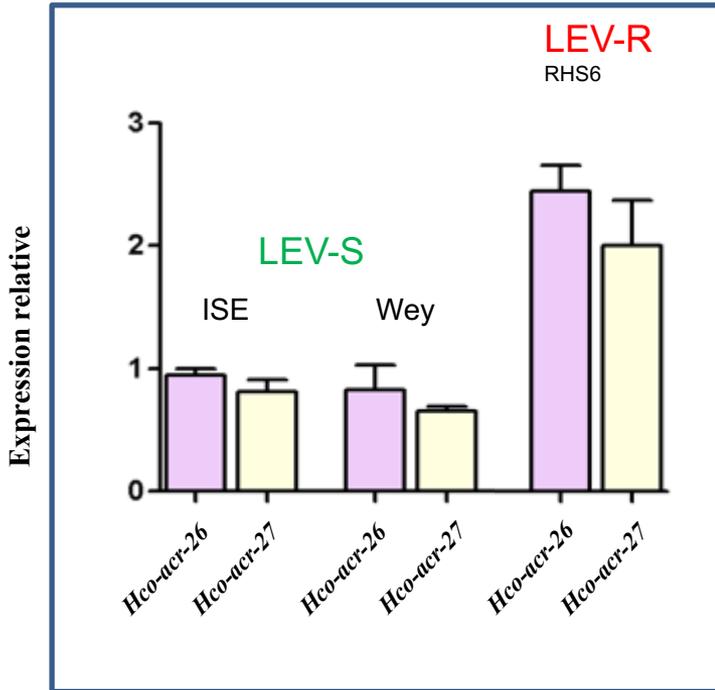


**ACR-26 et ACR-27 des parasites *H. contortus* et *P. equorum* forment des hétéropentamères fonctionnels *in vivo* qui confèrent la sensibilité au Mor au *C. elegans* transgéniques**



*C. elegans*

# M-AChR et la Résistance au levamisole et au Pyrantel



Les isolats LEV R<sup>++</sup>/pyr  
sont hypersensibles au Morantel *in-vitro* !

Perte du sous-type L-AChR  
compensé par la surexpression du M-AChR ?

**Un point faible des parasites résistants !**

La recherche de nouveaux anthelminthiques  
capables d'activer le M-AChR est en cours

L'étude de l'acquisition de l'hypersensibilité  
associée à une résistance est actuellement étendue  
à d'autres espèces et d'autres familles d'anthelminthiques

## Équipe MPN

Claude Charvet  
Elise Courtot  
Abdallah Harmache  
Fabrice Guegnard  
Jacques Cortet

## Collaborateurs

Robin BEECH (McGill Univ.)  
  
Adrian Wolstenholme (Univ. Of Georgia)  
Barbara Reaves (Univ. Of Georgia)  
  
Lindy Holden-Dye (Southampton Univ.)  
Vincent O'Connor (Southampton Univ.)  
  
Debra Woods (Zoetis/ Kalamazoo)  
  
Thomas Boulin (ENS / INSERM)