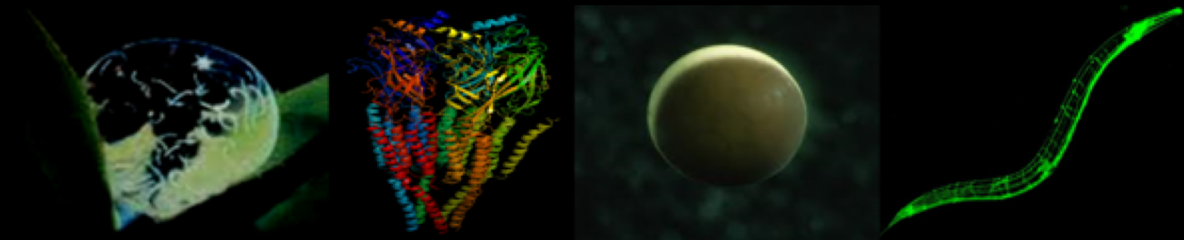


Nouvelles approches pour le contrôle des parasites résistants aux vermifuges



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



Carrefours de l'innovation
agronomique

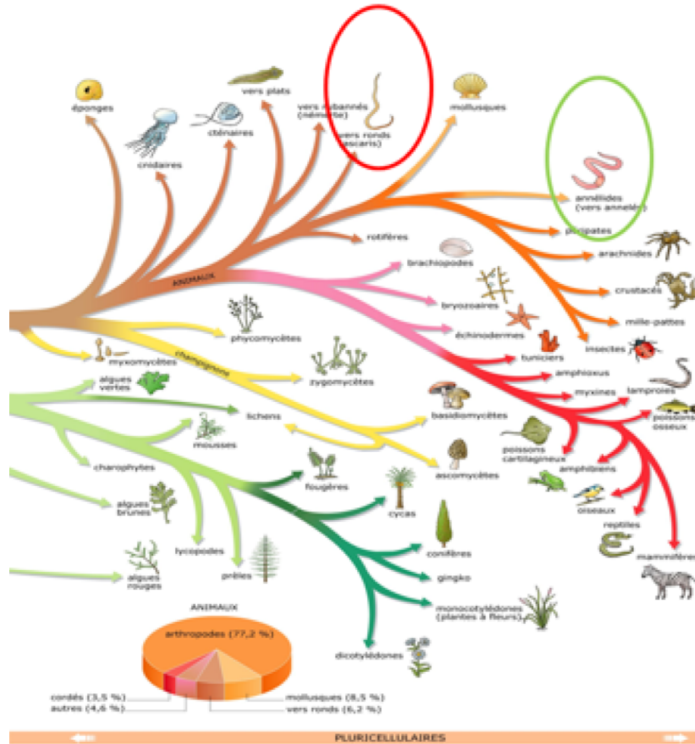


Prévenir et guérir les maladies infectieuses dans le concept One Health



21 juin 2018 | Lycée Descartes | Tours

Les nématodes



➤ 4/5 des animaux sur terre sont des nématodes

➤ On estime que dans 1cm³ de sol :

1-5 km d'hyphe de champignon

10⁶-10⁹ bactéries

10-60000 protozoaires

50-100 nématodes

<1 collembole

<1 acarien



➤ Taille :

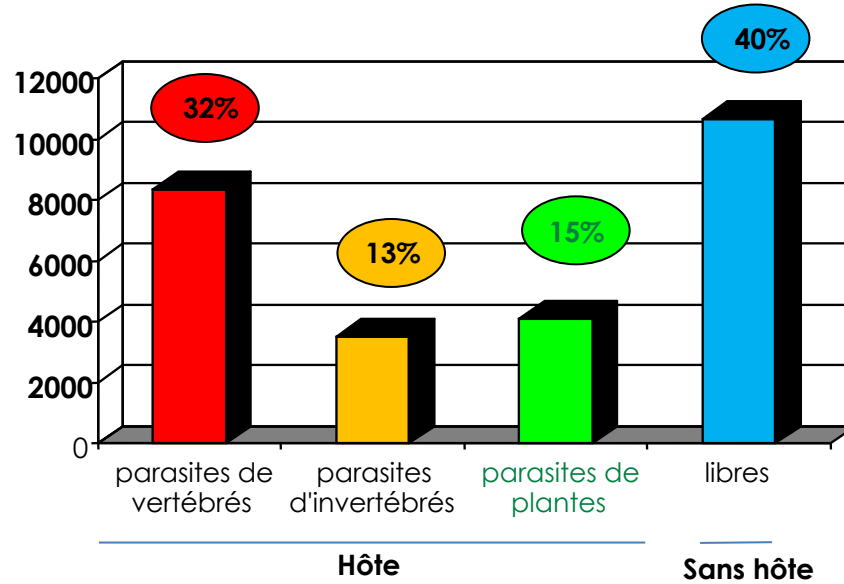
Généralement microscopiques : 1/10 de millimètres

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

Nématodes ≠ Vers de terre

plusieurs millions d'années de divergence !

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)

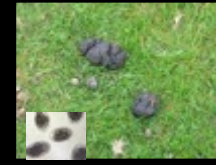


Brugia malayi (vecteur)



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:

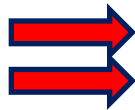
la résistance est présente à des degrés divers mais contre toutes les molécules disponibles sur le marché !

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:

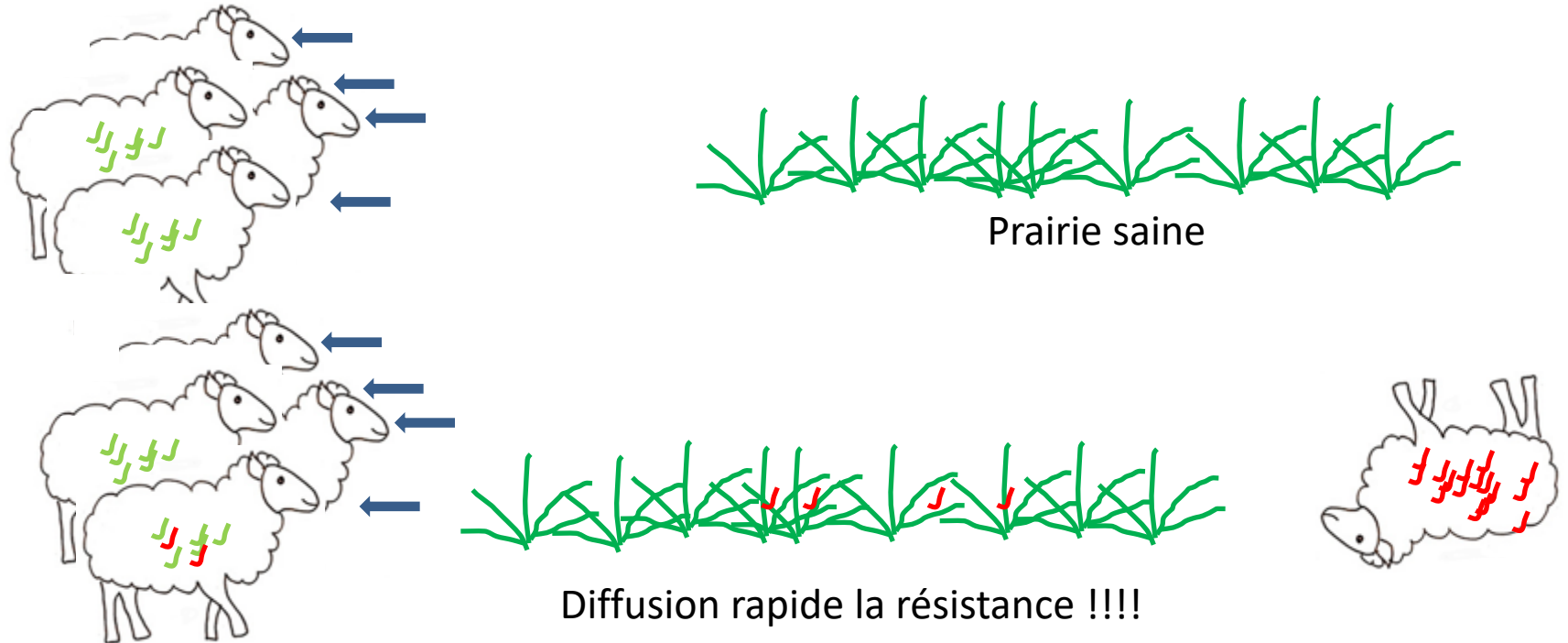


Une réponse à la demande sociétale

Une nécessité absolue pour les éleveurs !!!!

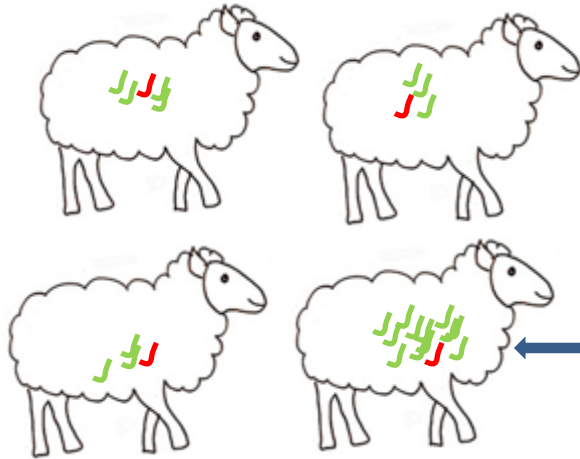
Optimiser les pratiques d'élevage dans un contexte de résistance

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



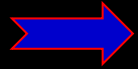
Coprosopies pour identifier les animaux les plus infestés
➡ Traitement ciblé avec une molécule encore efficace...



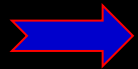
Prairie contaminée

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



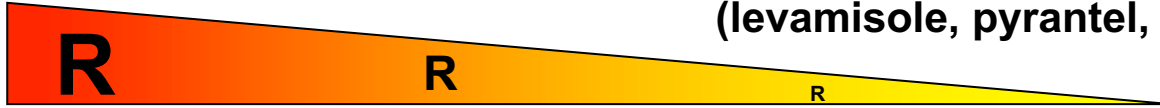
Identifier les mécanismes moléculaires impliqués
dans l'acquisition de la résistance
diagnostiquer précocement la résistance,
optimiser l'usage des molécules disponibles

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)**

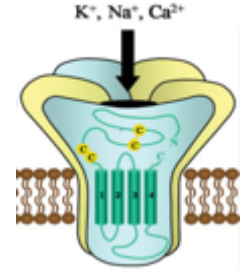
Cibles des agonistes cholinergiques

(Levamisole, Pyrantel, Morantel....)

Récepteurs à l'acétylcholine: AChRs

Canaux ioniques (ligand-dépendant)

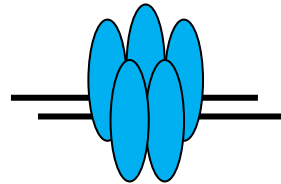
Impliqués dans les neurotransmissions synaptiques



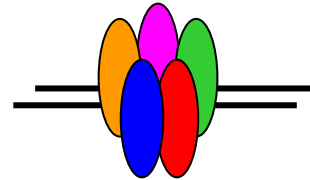
Les agonistes cholinergiques induisent une activation permanente des récepteurs localisés au niveau des jonctions neuro-musculaires

 Paralyse du nématode

Constitués de 5 sous-unités

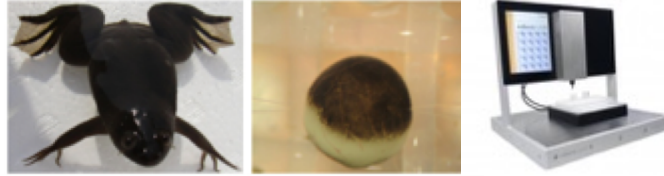


Homopentamère



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

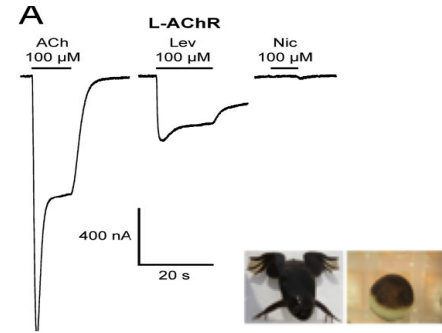
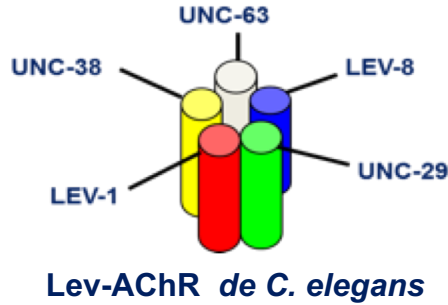
***C. elegans* est sensible aux anthelminthiques**

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

Criblage de mutants résistants au Lev



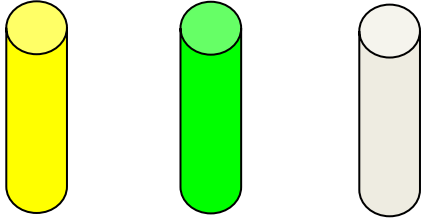
lev-1 nAChR subunit
lev-8 nAChR subunit
unc-29 nAChR subunit
unc-38 nAChR subunit
unc-63 nAChR subunit



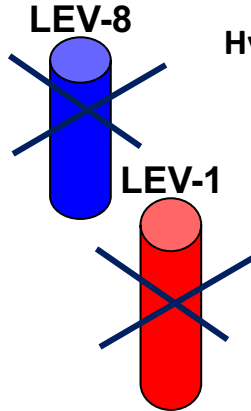
Boulin *et al.* 2008

Transposition aux espèces parasites ?

UNC-38 UNC-29 UNC-63



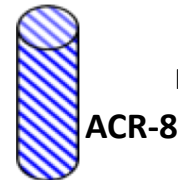
Homologues de ces sous-unités
chez tous les nématodes



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**

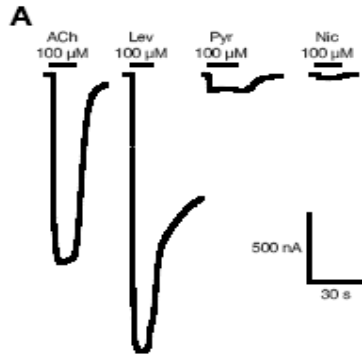
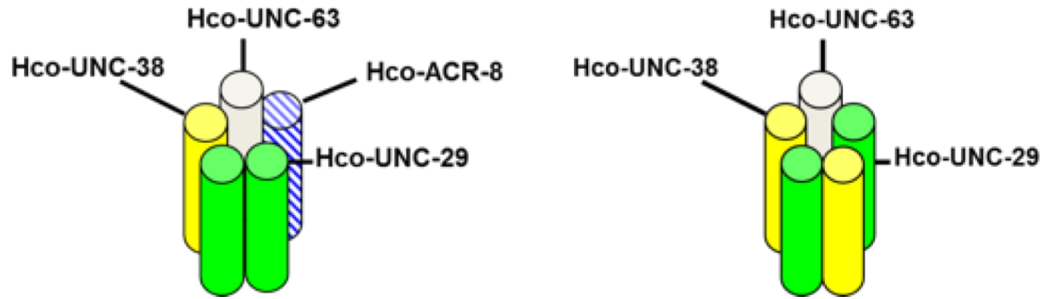


Le plus proche homologue de LEV-8
Présent chez tous les parasites sensibles au levamisole

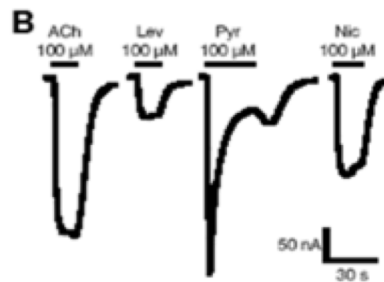


Les récepteurs recombinants d'*H. contortus*

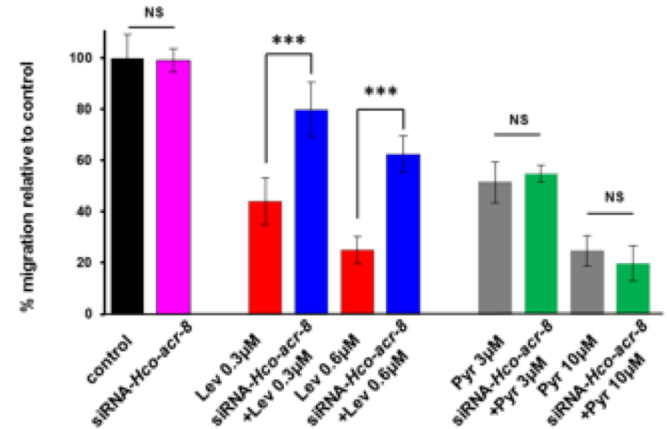
H. contortus



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

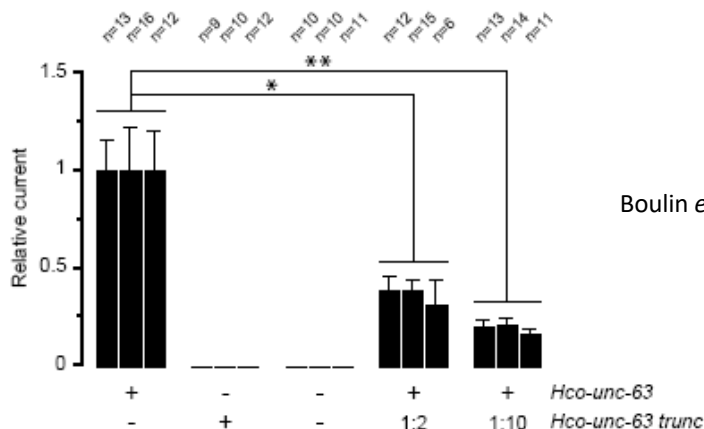
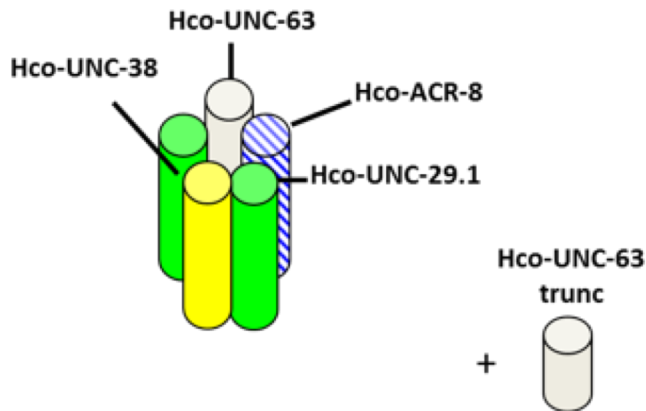


R++

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

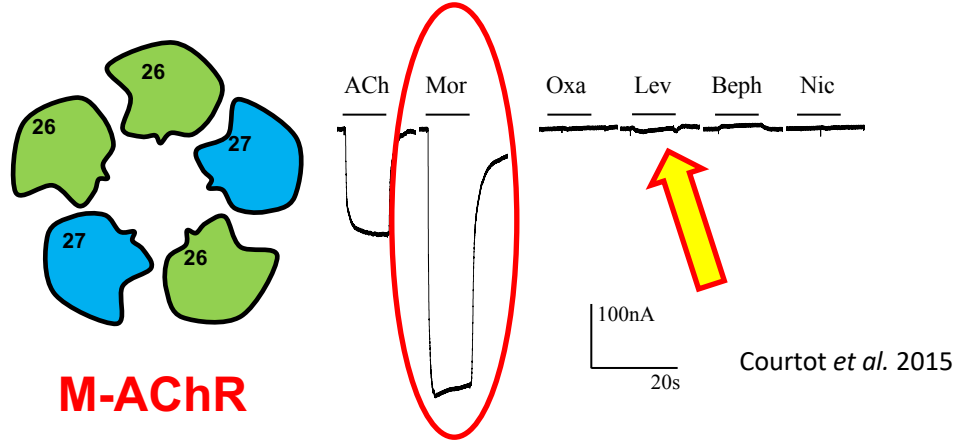
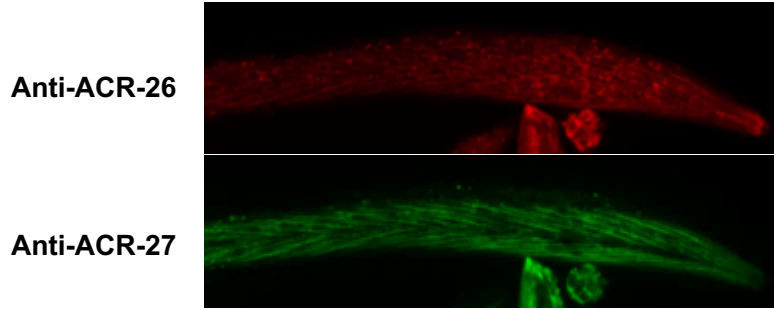
Les hypothèses

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

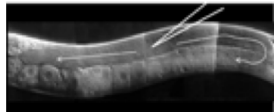
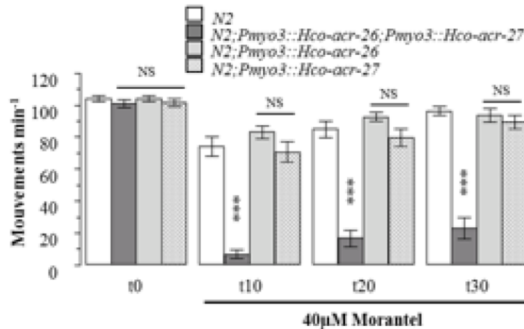
Pour les résistants « double doses » UNC-63 trunc
Résistance croisée Lev-Pyr que l'on pouvait anticiper à partir de ces résultats confirmée sur des isolats du terrain ou sélectionnés artificiellement...

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).

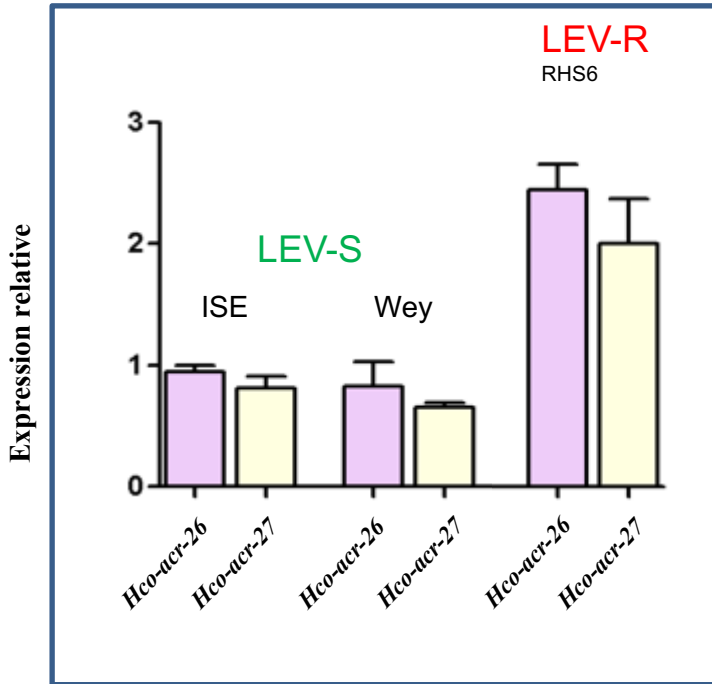


ACR-26 et ACR-27 des parasites *H. contortus* et *P. equorum* forment des hétéropentamères fonctionnels *in vivo* qui confèrent la sensibilité au Mor au *C. elegans* transgéniques



C. elegans

M-AChR et la Résistance au levamisole et au Pyrantel



Les isolats LEV R⁺⁺/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)