

Nouvelles approches pour le contrôle des parasites résistants aux vermifuges

Charvet C.L., Courtot E., Harmache A., Guegnard F., Neveu C.¹

¹ INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly

Correspondance: cedric.neveu@inra.fr

Résumé

Les méthodes de lutttes employées contre les nématodes parasites qui impactent la santé humaine ou animale sont remises en cause par l'émergence d'isolats capables de développer des résistances aux vermifuges (anthelminthiques). Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de ce phénomène ainsi que l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques pour la découverte de nouveaux anthelminthiques sont indispensables au développement de stratégies de gestion du parasitisme efficaces et plus durables.

Mots-clés : Nématodes, Anthelminthiques, Résistance

Abstract: Novel approaches for the control of anthelmintic resistant parasitic nematodes

The control of parasitic nematode infections in humans, livestock and companion animals is critically dependent on anthelmintic treatment. However, the indiscriminate use of anthelmintic drugs has inevitably led to the selection of resistant parasites. In this respect there is currently an urgent need to increase our knowledge on the mode of action of available anthelmintics as well as to identify novel targets for the development of next generation anthelmintic drugs.

Keywords : Nematodes, Anthelmintics, Resistance

Introduction

Les nématodes sont des vers ronds non-segmentés appartenant au phylum Nematoda. Les espèces parasites d'animaux représentent 45% des espèces décrites et possèdent une large gamme d'hôtes comprenant des invertébrés (arthropodes, mollusques, annélides) et des vertébrés (mammifères, oiseaux), (Hugot *et al.*, 2001). Leur taille est très variable allant de quelques millimètres à plusieurs mètres en fonction de l'hôte. Chez l'Homme, les infestations par les nématodes parasites impactent environ le quart de la population mondiale et certaines espèces ont un impact majeur sur la santé humaine (ascaridiose, onchocercose, filarioses lymphatiques...). De même, chez les animaux de rente, les infections liées aux nématodes engendrent d'importantes pertes économiques dans les élevages à travers le monde. Ces parasites seraient responsables de plus de 55% des maladies infectieuses au sein des élevages (Morgan *et al.*, 2013).

Les coûts associés à ces infestations sont difficiles à chiffrer, cependant quelques estimations existent dans la littérature : 84 millions £ au Royaume Uni (Nieuwhof et Bishop, 2005), et au sein de toute l'Union Européenne les dépenses annuelles estimées pour les traitements anthelminthiques pour contrôler ces infections chez les ruminants sont de l'ordre de 400 millions € (Selzer, 2009).

Dans les élevages de ruminants, *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis* sont les espèces de nématodes parasites les plus pathogènes. Ces parasites communément appelés « strongles digestifs » mesurent environ 1cm aux stades adultes (mâles et

femelles) et présentent un cycle de vie monoxène. Les œufs des parasites sont émis dans les matières fécales de l'hôte et se développent en larves infestantes (L3) au niveau du pâturage. Suite à l'ingestion de ces larves par le ruminant, les parasites se développent dans leur hôte au niveau de la caillette (*H. contortus*, *T. circumcincta*) ou de l'intestin grêle (*T. colubriformis*). Les strongles digestifs présentent un impact majeur sur la santé animale et sont responsables de lourdes pertes économiques liées à des baisses de productions (viande, lait) ainsi qu'à la mortalité des jeunes animaux. Le contrôle efficace de ces parasites représente donc un enjeu crucial pour les élevages de ruminants. A l'heure actuelle, en l'absence d'une stratégie de lutte alternative efficace, le contrôle des strongles digestifs est essentiellement basé sur l'utilisation d'un nombre restreint de molécules anthelminthiques (vermifuges). Le recours intensif à ces traitements a donc conduit à l'émergence de populations de parasites résistants à l'une ou plusieurs des familles de molécules disponibles sur le marché, remettant en cause la pérennité de cette méthode de lutte. Par ailleurs, certains anthelminthiques de la famille des lactones macrocycliques (avermectines) qui ont également une activité insecticide se retrouvent dans les matières fécales des animaux traités. Ces molécules à large spectre peuvent donc avoir un impact négatif sur les insectes coprophages (Wall et Strong, 1987).

Dans le but d'établir des stratégies de gestion du parasitisme plus efficaces et plus durables, nous étudions les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux anthelminthiques et nous recherchons de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de nouveaux anthelminthiques plus sélectifs et donc plus respectueux de l'environnement. En effet, si les molécules à large spectre étaient autrefois recherchées en priorité ces recherches dont les applications peuvent être directement transposables aux parasites humains s'inscrivent donc parfaitement dans le concept « One Health ».

1. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la résistance aux anthelminthiques chez les strongles digestifs : exemple du levamisole

Dans un contexte de résistance, parmi les trois familles d'anthelminthiques les plus couramment utilisées actuellement en élevage, les imidazothiazoles (levamisole) sont restés les plus efficaces malgré une utilisation datant de plusieurs décennies. En effet, contrairement aux benzimidazoles et aux avermectines, chez les trois principales espèces de strongles d'intérêt agronomique (*H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*) l'acquisition de la résistance au levamisole est moins fréquente et moins rapide. L'utilisation du levamisole constitue encore actuellement une solution efficace pour contrôler les populations de strongles digestifs résistantes aux benzimidazoles ou aux avermectines. Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la résistance au levamisole est donc déterminante pour prolonger l'efficacité de cette molécule. Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance au levamisole chez les strongles digestifs, nous avons développé deux approches complémentaires. La première est basée sur une approche de type « gènes candidats », la seconde sur une approche sans « *a priori* » basée sur la comparaison du matériel génétique de parasites sensibles ou résistants au levamisole.

1.1 Approche « gènes candidats »

La cible pharmacologique du levamisole est une sous-population de récepteurs cholinergiques (levamisole-sensible AChR: L-AChR) localisée au niveau de la jonction neuro-musculaire des nématodes. Ces canaux ioniques sont constitués d'un assemblage de 5 sous-unités qui peuvent être identiques (homopentamères) ou différentes (hétéropentamères). Le levamisole induit l'activation prolongée des L-AChRs entraînant une hyper-contraction musculaire et la paralysie des vers. Chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*, qui est très proche des strongles d'un point de vue phylogénétique, la sélection de mutants résistants au levamisole a permis d'identifier 5 gènes (*unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* et *lev-8*) codant les différentes sous-unités potentielles du L-AChR. La nomenclature de ces gènes est basée sur le phénotype associé à leur invalidation : les mutants UNC

(pour uncoordinated) présentent une locomotion non coordonnée alors que, les mutants LEV (pour levamisole-resistant) sont résistants au levamisole mais présentent une mobilité normale.

Chez les strongles digestifs, des études électrophysiologiques et pharmacologiques ont montré que la résistance au levamisole pouvait résulter soit d'une altération de la fonctionnalité des L-AChRs soit d'une réduction de leur nombre (Sangster *et al.*, 1998). Cependant les bases moléculaires de cette résistance restaient à élucider. Dans ce contexte, notre premier objectif a été d'identifier les homologues des gènes codant pour les sous-unités potentielles du L-AChR de *C. elegans* chez les espèces de strongles *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*.

Quand ce travail a été initié, les ressources génomiques disponibles pour les strongles digestifs étaient extrêmement limitées. Nous avons cependant réussi à identifier, chez les trois espèces de strongles, des séquences d'ADNc présentant de fortes homologues avec des gènes *unc-29*, *lev-1*, *unc-63*, *unc-38* de *C. elegans* (Neveu *et al.*, 2010). Il faut noter qu'aucune des séquences partielles identifiées chez les trois espèces de strongles ne présentait d'homologie avec le gène *lev-8* de *C. elegans*. En revanche des homologues du gène *acr-8* (acetylcholine receptor subunit n°8) étroitement apparenté au gène *lev-8* ont été identifiés chez les 3 espèces de parasites. De manière intéressante, l'analyse des séquences protéiques des homologues d'ACR-8 des parasites a révélé la présence de nombreuses signatures en acides aminés de LEV-8, notamment au niveau du site de fixation potentiel du levamisole. Cette dernière observation pouvait donc suggérer une éventuelle participation de la sous-unité ACR-8 des strongles dans la constitution de leur L-AChR. L'identification des ADNc complets correspondant aux homologues de *lev-1*, *unc-29*, *unc-63* et *unc-38* a montré chez les trois espèces étudiées des caractéristiques communes inattendues. En effet, nous avons pu mettre en évidence l'existence de 4 copies du gène *unc-29* ainsi que l'absence potentielle de peptide signal de sécrétion dans les séquences protéiques déduites des homologues du gène *lev-1*. Cette dernière observation est d'autant plus surprenante que l'association des sous-unités des AChRs se déroule dans le réticulum endoplasmique. Dans ce contexte, l'absence d'un peptide signal de sécrétion dans les séquences protéiques déduites de la sous-unité LEV-1 des trois strongles pose la question de la participation de cette sous-unité dans la constitution des récepteurs fonctionnels *in vivo*.

Dans le but d'identifier d'éventuels polymorphismes associés à la résistance, l'expression ainsi que les séquences des ADNc des homologues des gènes *unc-38*, *unc-63*, *lev-1* et des paralogues du gène *unc-29* ont été comparées chez des isolats sensibles et résistants au levamisole des 3 espèces de strongles. Chez tous les isolats, l'expression des ADNc complets de toutes les sous-unités a été mise en évidence. L'analyse comparative des séquences obtenues chez les isolats sensibles et résistants au levamisole n'a pas révélé de polymorphisme associé à la résistance. En revanche, chez des isolats résistants d'*H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, l'expression spécifique d'ARNm codant une forme tronquée de la sous-unité UNC-63 a été observée. La co-expression de l'homologue d'UNC-63 et d'une forme tronquée de cette même sous-unité a été confirmée par Western blot chez l'isolat résistant RHS6 d'*H. contortus*. Ces résultats suggéraient donc une implication des formes tronquées d'UNC-63 dans la résistance au levamisole chez certains isolats de strongles.

1.2 Approche transcriptomique sans « a priori »

Parallèlement à l'approche gènes candidats, la première analyse différentielle des transcriptomes d'*H. contortus* sensibles ou résistants au levamisole a été réalisée au laboratoire. Pour cette étude, 4 isolats d'*H. contortus* d'origine géographique distincte ont été utilisés (2 sensibles et 2 résistants au levamisole). Pour l'ensemble des isolats environ 17280 fragments de transcrits ou TDFs (Transcript Derived Fragments) ont été amplifiés. Parmi ces TDFs, ceux présentant un polymorphisme commun aux deux populations résistantes ou sensibles ont été analysés en priorité. Au total, 26 candidats ont été identifiés et l'un d'entre eux nommé HA17 a été caractérisé plus en détails. Ce gène spécifiquement exprimé chez les isolats résistants correspondait au premier marqueur de résistance au levamisole

identifié chez un nématode parasite (Neveu *et al.*, 2007). De manière intéressante, parmi les autres marqueurs spécifiquement détectés chez les isolats résistants, l'un d'entre eux correspondait à une séquence partielle de l'orthologue du gène *acr-8* de *C. elegans* codant une forme tronquée de cette sous-unité (*Hco-acr-8b*), (Fauvin *et al.*, 2010). Pour rappel, le gène *acr-8* est étroitement apparenté au gène *lev-8* de *C. elegans* pour lequel nous n'avons pas pu trouver d'orthologue chez les strongles digestifs. L'expression spécifique de *Hco-acr-8b* a été confirmée au laboratoire chez un troisième isolat résistant de notre collection, mais également dans le cadre d'études menées par d'autres équipes (Williamson *et al.*, 2011 ; Sarai *et al.*, 2013 ; Barrère *et al.*, 2014).

1.3 Expression fonctionnelle des L-AChRs de nématodes parasites dans l'œuf de xénope

En 2008, l'équipe du Dr. Jean-Louis Bessereau a démontré que la co-expression des sous-unités UNC-38, UNC-63, UNC-29, LEV-1 et LEV-8 de *C. elegans* avec les protéines accessoires RIC-3, UNC-50 et UNC-74 permettait de reconstituer un L-AChR fonctionnel dans l'œuf du batracien *Xenopus laevis* (Boulin *et al.* 2008). Dans le cadre d'un travail collaboratif nous avons cherché à exploiter ce système d'expression hétérologue avec pour objectifs de : **1)** déterminer la composition en sous-unités du L-AChR d' *H. contortus*; **2)** étudier ses propriétés pharmacologiques; **3)** tester l'implication des formes tronquées des sous-unités identifiées chez les parasites résistants dans l'altération de la fonctionnalité du récepteur. Cependant, quand cette collaboration a été initiée, nos chances de succès étaient très modérées. En effet, pour le L-AChR de *C. elegans*, il venait d'être clairement établi que l'ensemble des 5 sous-unités (UNC-38, UNC-63, UNC-29, LEV-1 et LEV-8) était indispensable à l'expression d'un L-AChR fonctionnel : le retrait d'une de ces sous-unités se traduisait par la perte d'expression du récepteur. Dans ce contexte, l'absence d'orthologue de LEV-8 et l'absence de peptide signal de sécrétion chez l'orthologue de LEV-1 ne pouvaient nous laisser présager des résultats obtenus par la suite. Après avoir identifié chez *H. contortus* les homologues des gènes *ric-3*, *unc-50* et *unc-74*, plusieurs combinaisons d'ARN complémentaire (ARNc) ont été micro-injectées dans les œufs de xénope afin d'observer l'éventuelle expression d'un récepteur sensible à l'acétylcholine et au levamisole. Dans un premier temps, les ARNc correspondant aux sous-unités Hco-UNC-29.1, Hco-UNC-38, Hco-UNC-63, Hco-LEV-1, Hco-ACR-8 et aux protéines accessoires Hco-RIC-3, Hco-UNC-50 et Hco-UNC-74 ont été co-injectés dans les œufs de xénope. Trois jours après l'injection, nous avons enregistré dans les œufs des courants très élevés de l'ordre du μA en réponse à l'application d'acétylcholine (100 μM) ou de levamisole (100 μM). Ces premiers résultats confirmaient l'expression fonctionnelle de L-AChRs d' *H. contortus*. Dans un second temps, nous avons donc cherché à déterminer la composition minimale en sous-unités des récepteurs fonctionnels. Les ARNc correspondant à la sous-unité Hco-LEV-1 (sans peptide signal) ont été retirés de la combinaison initiale sans aucune modification des courants induits par l'acétylcholine ou le levamisole. Ce résultat suggérait l'absence d'implication de cette sous-unité dans la composition des récepteurs fonctionnels. Pour cette raison, les ARNc correspondant à la sous-unité Hco-LEV-1 n'ont plus été inclus pour les expériences suivantes. Par la suite, les ARNc correspondant à la sous-unité Hco-ACR-8 ont été retirés du mélange. De manière inattendue, la combinaison résultante (Hco-UNC-29.1, Hco-UNC-38, Hco-UNC-63, Hco-RIC-3, Hco-UNC-50 et Hco-UNC-74) a permis d'obtenir un second L-AChR fonctionnel. Enfin, nous avons montré que le retrait d'une des sous-unités Hco-UNC-29.1, Hco-UNC-38, Hco-UNC-63 ou le retrait des protéines accessoires entraînait la perte d'expression des récepteurs. Les deux sous-types de L-AChR fonctionnels d' *H. contortus* ont été nommés Hco-L-AChR-1 (Hco-UNC-29.1, Hco-UNC-38, Hco-UNC-63, Hco-ACR-8) et Hco-L-AChR-2 (Hco-UNC-29.1, Hco-UNC-38, Hco-UNC-63). La caractérisation pharmacologique de Hco-L-AChR-1 et Hco-L-AChR-2 a permis de mettre en évidence des différences majeures quant à leur sensibilité respective aux agonistes cholinergiques tels que le levamisole, le pyrantel, le buphenium ou la nicotine (Boulin *et al.*, 2011 ; Charvet *et al.*, 2012).

En résumé, Hco-L-AChR-1 est un récepteur beaucoup plus sensible au levamisole qu'au pyrantel et à la nicotine et inversement, Hco-L-AChR-2 est plus sensible au pyrantel et à la nicotine qu'au levamisole. Ces résultats mettaient donc en avant le rôle potentiel de la sous-unité ACR-8 dans la sensibilité des parasites au levamisole et suggéraient que le pyrantel pouvait cibler un autre récepteur chez le parasite. Grâce au récent développement de la technologie d'ARN interférence chez le parasite *H. contortus*, notre équipe a confirmé « *in-vivo* » l'implication de la sous-unité ACR-8 dans la sensibilité au levamisole et a démontré pour la première fois que le levamisole et le pyrantel ciblent deux récepteurs indépendants chez cette espèce, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives quant à l'exploitation raisonnée de ces deux molécules pour la gestion de la résistance en élevage (Blanchard *et al.*, 2018).

1.4 Implication de la forme tronquée de Hco-UNC-63 dans l'acquisition de la résistance au levamisole

En l'absence de méthodes de transformations efficaces chez les strongles digestifs, l'expression fonctionnelle de L-AChR d'*H. contortus* en œufs de xénope représentait alors une approche alternative intéressante pour tester l'implication potentielle des formes tronquées d'AChRs dans la résistance au levamisole. Des ARNc correspondant à la forme tronquée de Hco-UNC-63 (identifiée chez l'isolat résistant RHS6 d'*H. contortus*) ont été co-injectés dans l'œuf de xénope avec les ARNc nécessaires à l'expression du récepteur Hco-L-AChR-1. Nous avons pu ainsi montrer que la forme tronquée de Hco-UNC-63 présentait un effet dominant négatif sur l'expression du récepteur. Dans ce contexte, si l'on émet l'hypothèse qu'un mécanisme similaire pourrait avoir lieu *in vivo*, ce résultat pourrait constituer la première validation fonctionnelle d'un mécanisme moléculaire impliqué dans l'acquisition de la résistance au levamisole chez un nématode parasite (Boulin *et al.*, 2011).

En conclusion, la stratégie consistant à développer en parallèle les approches «gènes candidats» et «transcriptomique» nous a permis de faire progresser très significativement d'une part nos connaissances des récepteurs aux levamisole des strongles digestifs et d'autre part la compréhension des mécanismes moléculaires potentiellement associés à l'acquisition de la résistance (Martin *et al.*, 2012). De plus, la maîtrise au sein du laboratoire du système d'expression des récepteurs cholinergiques des nématodes parasites en œufs de xénope constitue dorénavant un atout majeur pour transposer nos résultats à d'autres espèces de nématodes parasites. A titre d'exemple, nous avons réalisé la reconstitution et la caractérisation pharmacologique de 4 sous-types de L-AChRs du nématode parasite du porc : *Oesophagostomum dentatum*. Chez ce parasite, nous avons également mis en évidence l'implication de la perte de l'un de ces sous-types dans l'acquisition de la résistance au levamisole (Charvet *et al.*, 2014).

2. Le nématode libre *Caenorhabditis elegans*, un nouveau modèle pour l'étude des espèces parasites

Plusieurs facteurs liés aux modèles parasitaires étudiés (données génomiques restreintes pour certaines espèces, absence d'outils de transgénèse, absence de culture *in vitro* des stades parasitaires) nous limitent dans nos investigations.

Le développement d'une stratégie de recherche basée sur l'exploitation d'une espèce de nématode modèle constituerait donc un atout déterminant pour accroître la portée de nos travaux et élargir nos champs thématiques. Dans ce contexte, le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* qui est étroitement apparenté aux espèces étudiées au sein de l'INRA, est l'espèce modèle la plus pertinente. Ce nématode de 1 mm de long vit à l'état libre dans le sol et se cultive aisément au laboratoire sur boîtes gélosées ensemencées de bactéries *E. coli*. Ce ver hermaphrodite a un cycle de développement rapide de 3 jours (21 à 28 jours pour les espèces parasites étudiées). Suite à l'autofécondation, chaque individu émet jusqu'à 300 œufs permettant ainsi d'obtenir rapidement de très grande quantité de vers.

La transformation stable de cet organisme par micro-injection dans les gonades ou biolistique est aisée. De même, la mise en œuvre de la technologie « ARN interférence » par « trempage » des vers est d'une grande simplicité. De plus, *C. elegans* est un ver translucide, ce qui facilite l'utilisation de marqueurs fluorescents pour des études d'imagerie *in vivo*. Cette espèce modèle est étudiée dans plus de 800 laboratoires dans le monde avec des thématiques aussi variées que la neurobiologie, la biologie du développement et du vieillissement, la signalisation cellulaire, la régulation génique (Kaletta et Hengartner, 2006). Le criblage de mutants de *C. elegans* résistants à différents anthelminthiques (agonistes cholinergiques, lactones macrocycliques, benzimidazoles) a permis d'identifier les gènes codant pour les cibles de ces drogues. Ces données sont donc à la base des stratégies « gène-candidat » visant à identifier ces cibles pharmacologiques chez les espèces parasites.

Cependant, si l'intérêt du modèle *C. elegans* pour l'étude des cibles moléculaires des anthelminthiques est déjà clairement établi (Holden-Dye et Walker, 2014); jusqu'à présent seul un nombre très restreint de laboratoires de parasitologie exploitait *C. elegans* pour les aspects fonctionnels de leur recherche. Avec l'avènement de nouvelles technologies d'édition ciblée du génome telle que le CRISPR-Cas-9, nous assistons actuellement à un nouvel engouement pour l'espèce modèle au sein des laboratoires étudiant les nématodes parasites (Zamanian et Andersen, 2016).

Dans ce contexte, notre objectif consiste actuellement à développer l'utilisation du nématode modèle *C. elegans* au sein du département de Santé Animale de l'INRA pour l'identification et l'exploitation raisonnée de nouvelles cibles pharmacologiques.

Les nématodes possèdent en effet une très grande diversité de gènes (102 chez *C. elegans*) codant pour des sous-unités de canaux ioniques ligand dépendant (récepteurs à l'acétylcholine, GABA, glutamate, sérotonine, tyramine, dopamine). Ces récepteurs constituent des cibles particulièrement attractives pour le développement de nouveaux antiparasitaires (Wolstenholme, 2011).

Dans le but de développer des traitements ciblés plus respectueux de l'environnement, nous cherchons à identifier parmi ces sous-unités, celles qui sont impliquées dans la constitution de récepteurs présentant des propriétés pharmacologiques spécifiques des nématodes parasites.

Pour ce projet, *C. elegans* est utilisé comme système d'expression hétérologue des cibles parasitaires. Cette approche permet de valider « *in-vivo* » les propriétés pharmacologiques déterminées à partir des récepteurs recombinants exprimés en œufs de xénope. Pour établir les bases de ce projet, des analyses bio-informatiques nous ont permis d'identifier des sous-unités d'AChR spécifiques des nématodes parasites de mammifères qui sont absentes chez les nématodes libres (notamment *C. elegans*) et les nématodes parasites de plantes. Nous avons montré que les sous-unités ACR-26 et ACR-27 étaient localisées dans les cellules musculaires des parasites et que leur co-expression dans les œufs de xénope conduisait à l'obtention de récepteurs cholinergiques fonctionnels. Ces nouveaux récepteurs, identifiés chez *H. contortus* (parasite des ovins) et *Parascaris equorum* (parasite des équins), étaient très sensibles au morantel : un agoniste cholinergique utilisé comme anthelminthique en élevage mais dont la cible moléculaire était alors inconnue. Nous avons montré que leur expression dans les cellules musculaires de *C. elegans* conférait une forte sensibilité au morantel chez les vers transgéniques alors que les vers témoins étaient quasiment insensibles à cet anthelminthique (Courtot *et al.*, 2015).

Ces résultats démontrent la pertinence de l'utilisation de *C. elegans* comme système d'expression hétérologue de cibles parasitaires et confirme la robustesse des résultats obtenus dans les œufs de xénope.

Récemment, nous avons démontré que l'expression de la sous-unité ACR-8 du parasite *H. contortus* était capable de restaurer la sensibilité au levamisole chez un mutant de *C. elegans* invalidé dans son gène *lev-8* (Blanchard *et al.*, 2018). Ce résultat constitue une première validation des hypothèses émises à partir des résultats obtenus en œufs de xénope, à savoir qu'en l'absence d'homologue de la

sous-unité LEV-8, la sous-unité ACR-8 des nématodes parasites joue un rôle déterminant dans la constitution de leur récepteur au levamisole (cf première partie de l'article). L'ensemble de ces premiers résultats permettent donc d'envisager une transposition de cette approche à d'autres cibles potentielles.

Pour appuyer cette démarche, nous utilisons au laboratoire la technologie CRISPR-Cas 9 chez *C. elegans*. Cet outil devrait nous permettre, à court terme, de remplacer des canaux ioniques de *C. elegans* par leurs homologues d'espèces parasites. Notre objectif consistera donc à obtenir des *C. elegans* "complémentés" dont la sensibilité aux anthelminthiques, la mobilité ou certaines fonctions physiologiques (émission des œufs, défécation, contraction pharyngienne) seront assurées par leurs homologues fonctionnels issus d'espèces parasites.

Dans le cadre de travaux préliminaires, nous avons déjà obtenu des lignées stables de *C. elegans* transgéniques pour lesquels différentes sous-unités d'AChR musculaire ont été remplacées avec succès par leurs homologues d'origine parasitaire. Ces premiers résultats constituent une première preuve de faisabilité pour l'approche envisagée.

Cette approche pourra donc être étendue à d'autres sous-unités de récepteurs cholinergiques, mais également à d'autres familles de canaux ioniques tels que les récepteurs sensibles au GABA, au glutamate ou aux canaux potassiques voltage-dépendants qui sont avec les agonistes cholinergiques les cibles des anthelminthiques les plus couramment utilisés en médecine vétérinaire (lactones macrocycliques et emodepside respectivement). De plus, l'INRA possédant une importante collection de nématodes parasites d'intérêt agronomique, cette stratégie permettra de caractériser et d'exploiter les cibles pharmacologiques des espèces les plus préjudiciables au niveau des filières animales (ovine, caprine, porcine, équine et bovine).

Les *C. elegans* transgéniques exprimant les récepteurs de parasites constitueront des modèles d'études particulièrement attractifs pour la caractérisation fonctionnelle des cibles parasitaires mais offriront également, à plus long terme, une alternative potentielle à l'utilisation des tests phénotypiques (criblages de molécules à potentiel effet anthelminthique) réalisés sur les stades larvaires des parasites. La réduction du nombre d'animaux à infester expérimentalement (ovins, bovins, porcins) pour obtenir les parasites nous permettra de répondre aux besoins éthiques de nos activités de recherche et de diminuer les coûts expérimentaux qui représentent une part croissante de nos budgets. De plus, ces modèles pourront être exploités pour étudier les cibles des espèces d'intérêt agronomique ou médical pour lesquels la culture *in vitro* n'est pas maîtrisée.

Références bibliographiques

- Barrère V., Beech R.N., Charvet C.L., Prichard R.K., 2014. Novel assay for the detection and monitoring of levamisole resistance in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 44(3-4):235-241
- Blanchard A., Guégnard F., Charvet C.L., Crisford A., Courtot E., Sauvé C., Harmache A., Duguet T., O'Connor V., Castagnone-Sereno P., Reaves B., Wolstenholme A.J., Beech R.N., Holden-Dye L., Neveu C., 2018 Functional investigations of cholinergic anthelmintic sensitivity in nematodes highlight major differences between the model *Caenorhabditis elegans* and parasitic species. *PLoS Pathogens* 14(5): e1006996.
- Boulin T., Gielen M., Richmond J.E., Williams D.C., Paoletti P., Bessereau J.L., 2008. Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 18590–18595.
- Boulin T., Fauvin A., Charvet C.L., Cortet J., Cabaret J., Bessereau J.L., Neveu C., 2011. Functional Reconstitution of *Haemonchus contortus* Acetylcholine Receptors in *Xenopus* Oocytes Provides Mechanistic Insights into Levamisole Resistance. *British Journal of Pharmacology*, 164 (5):1421-1432.
- Charvet C.L., Robertson A.P., Cabaret J., Martin R.J., Neveu C., 2012. Selective effect of the anthelmintic bephenium on *Haemonchus contortus* levamisole-sensitive acetylcholine, *Invertebrate Neuroscience*, 12(1):43-51

- Charvet C.L., Buxton S.K., Neveu C., Cabaret J., Cortet J., Peineau N., Abongwa M., Courtot E., Robertson A.P., Martin R.J., 2014. Investigation of acetylcholine receptor diversity in a nematode parasite leads to characterization of tribendimidine and derquantel-sensitive nAChRs. *PLoS Pathogens* 10(1):e1003870.
- Courtot E., Charvet C.L., Beech R.N., Harmache A., Wolstenholme A.J., Holden-Dye L., O'Connor V., Peineau N., Woods D.J., Neveu C., 2015. Functional characterization of a novel class of morantel-sensitive acetylcholine receptors in nematodes. *PLoS Pathogens*, 11(12): e1005267
- Fauvin A., Charvet C., Issouf M., Cortet J., Cabaret J., Neveu C., 2010. cDNA-AFLP analysis in levamisole-resistant *Haemonchus contortus* reveals alternative splicing in a nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170 (2):105-107.
- Holden-Dye L., Walker R.J., 2014. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, Dec 16:1-29.
- Hugot J.P., Baujard P., Morand S., 2001. Biodiversity in Helminths and Nematodes as a Field of Study: an Overview. *Nematology*, 3, 199-208.
- Kaletta T., Hengartner M.O., 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 387-399.
- Martin R.J., Robertson A.P., Buxton S.K., Beech R.N., Charvet C.L., Neveu C., 2012. Levamisole receptors: a second awakening. *Trends in Parasitology*, 28(7):289-96.
- Morgan E.R., Charlier J., Hendrickx G., Biggeri A., Catalan D., vonSamson-Himmelstjerna G., et al., 2013 Globalchange and helminth infections in grazing ruminants in Europe: impacts, trends and sustainable solutions. *Agriculture*,3:484–502.
- Neveu C., Charvet C., Fauvin A., Cortet J., Castagnone-Sereno P., Cabaret J., 2007. Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA-AFLP approach. *Parasitology*, 134:1105-1110.
- Neveu C., Charvet C.L., Fauvin A., Cortet J., Beech R., Cabaret J., 2010. Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematodes and abbreviated transcripts associated with resistance. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(7):414-425.
- Nieuwhof G.J., Bishop S.C., 2005. Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Animal Science*, 81:23-9.
- Sarai R.S., Kopp S.R., Coleman G.T., Kotze A.C., 2013. Acetylcholine receptor subunit and P-glycoprotein transcription patterns in levamisole-susceptible and resistant *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol. Drugs and Drug Resistance*, 3: 51-58.
- Sangster N.C., Riley F.L., Wiley L.J., 1998. Binding of [3H]m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol*, 28:707–717.
- Selzer P.M., 2009. In *Antiparasitic and Antibacterial Drug Discovery. From Molecular Targets to Drug Candidates*; Wiley-Blackwell: Hoboken, USA ; pp. 11-12.
- Williamson S.M., Storey B., Howell S., Harper K.M., Kaplan R.M., Wolstenholme A.J., 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol.*, 180(2):99-105.
- Zamanian M., Andersen E.C., 2016. Prospects and challenges of CRISPR/Cas genome editing for the study and control of neglected vector-borne nematode diseases. *FEBS J.*, Jun 14. doi: 10.1111/febs.13781.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « *Innovations Agronomiques* », la date de sa publication, et son URL ou DOI).