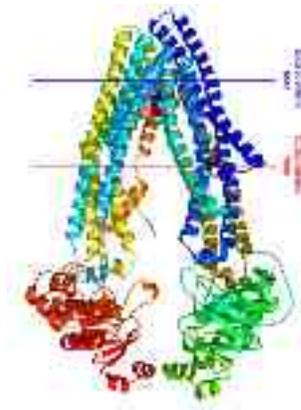


La maîtrise des pompes d'efflux un progrès dans la lutte contre les nématodes parasites

Dominique Kerboeuf
Mickaël Riou
INRA, Tours-Nouzilly



6 octobre 2011 AVF, Paris

1

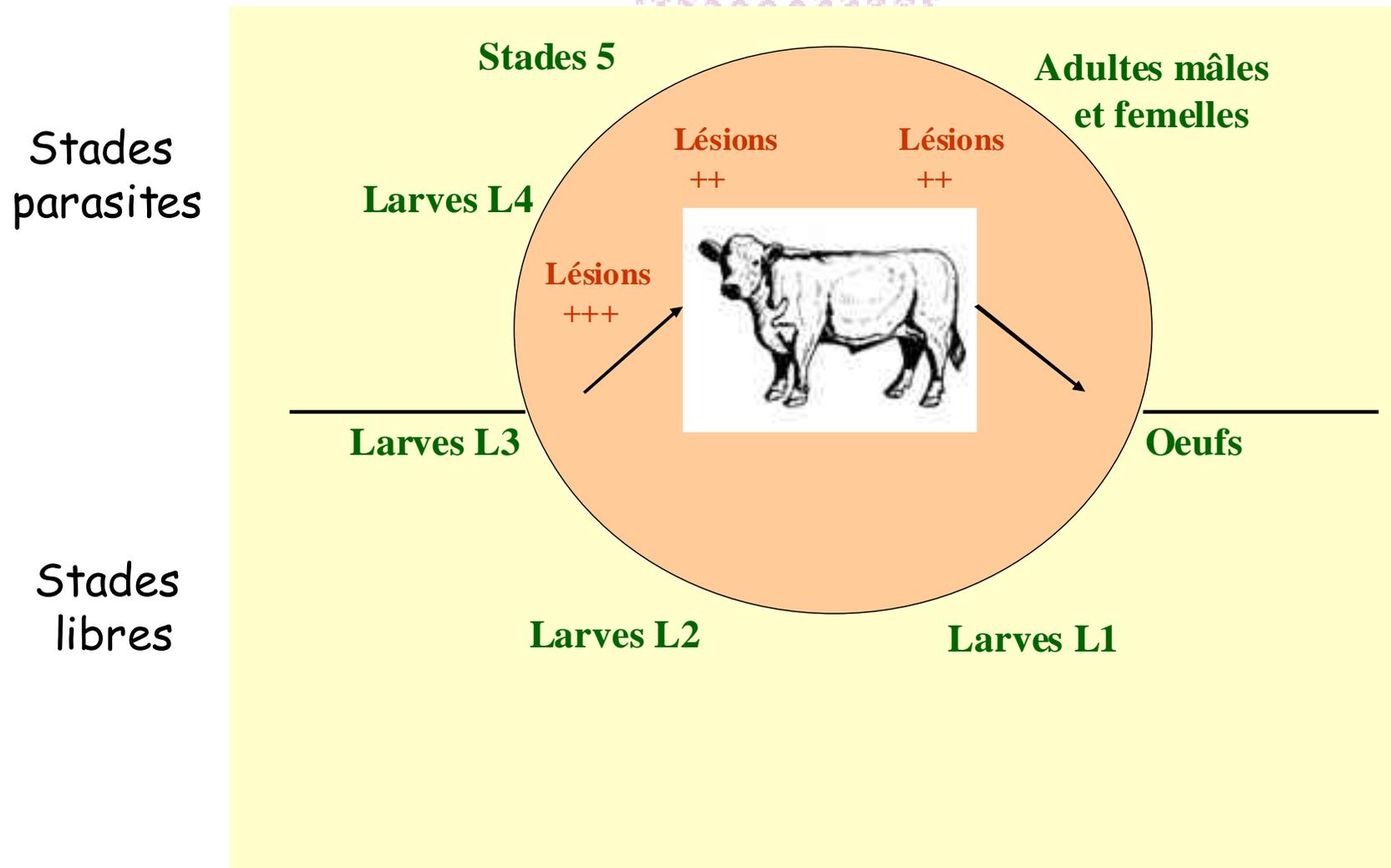
ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Les nématodes parasites

- Parasites très répandus, pathogènes
- Responsables de pertes économiques directes ou indirectes
- Lutte à l'aide d'anthelminthiques
- Inconvénients : coût, toxicité, résidus (produits animaux, environnement), temps d'attente (lait, viande)
- Développement de résistance

Cycle des strongles gastro-intestinaux



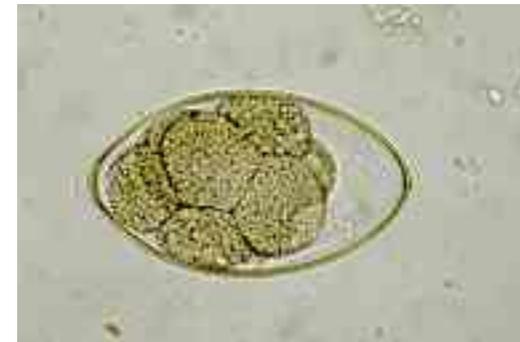
Morphologie



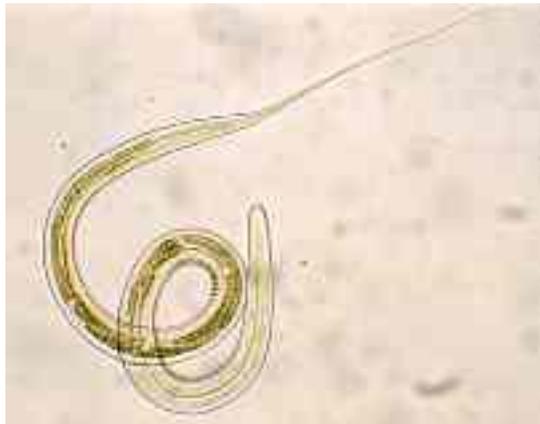
Œuf de Cooperia



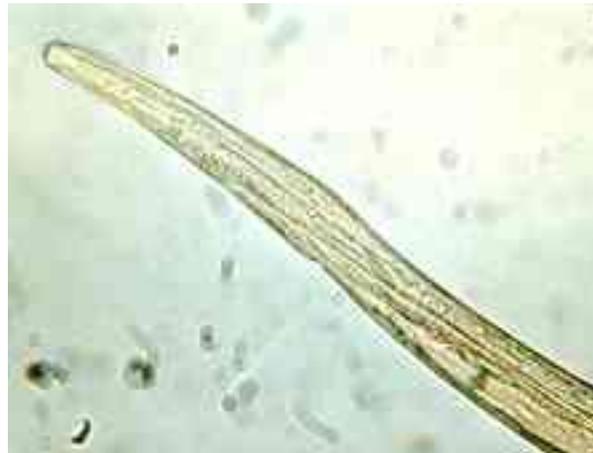
Œuf embryonné



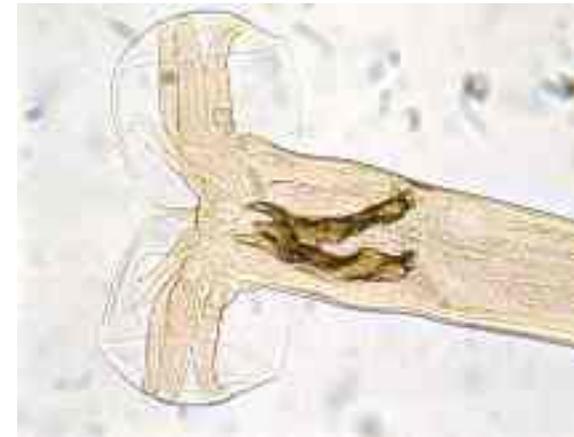
Œuf de Nematodirus



Larve L3



Extrémité antérieure
Ver adulte

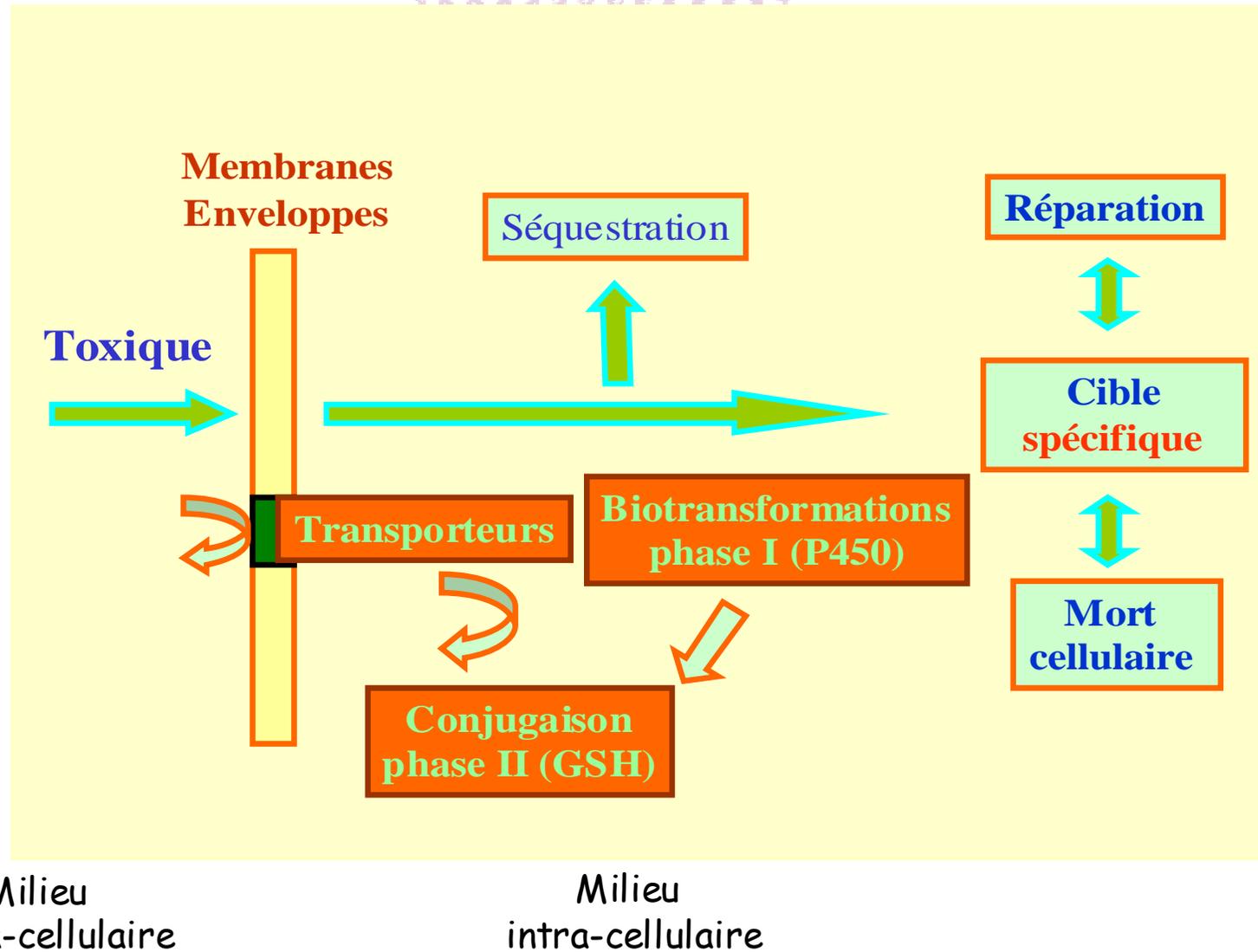


Bourse caudale
Ver mâle

Nématodes et xénobiotiques

- Tous les nématodes, y compris les nématodes libres (ex. *Caenorhabditis elegans*) sont confrontés à des xénobiotiques toxiques
- Composés du sol (naturels ou polluants); substances de l'hôte; médicaments, en particulier les **anthelminthiques**
- Processus adaptatifs très développés chez les parasites
- Survie liée à des systèmes de défense plus ou moins spécifiques envers le xénobiotique (mutations, détoxification)
- Une certaine ressemblance avec les autres organismes

La détoxification chez les eucaryotes



"Multi-Drug Resistance" (MDR)

❖ Transporteurs ABC

- Protéines intra-membranaires
- Efflux actif de xénobiotiques de structure chimique variée = "pompes" cellulaires
- Impliqués dans la "multidrug-resistance" de nombreux modèles biologiques, en particulier des cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie

❖ Gènes ubiquistes conservés de la bactérie à l'homme

Transporteurs ABC et anthelminthiques

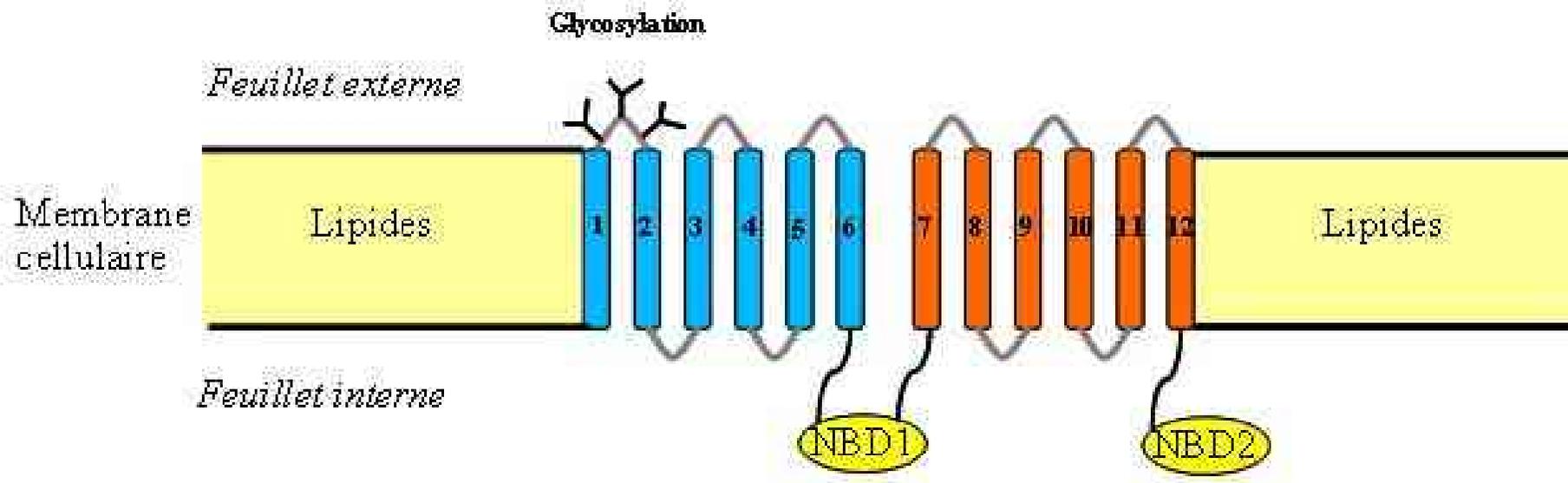
Chez l'animal

- Nombreux transporteurs ABC : ex. glycoprotéine P (Pgp), "Multidrug associated-Resistance Protein" (MRP), "Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)
- Sécrétion substances biologiques (tube digestif, système nerveux ...), élimination de toxiques, neurotoxicité de l'ivermectine (Pgp)
- Changement de la biodisponibilité des lactones macrocycliques par co-administration de modulateurs de transporteurs ABC : vérapamil, quercétine, lopéramide, itraconazole, valspodar, kétoconazole

Chez les parasites

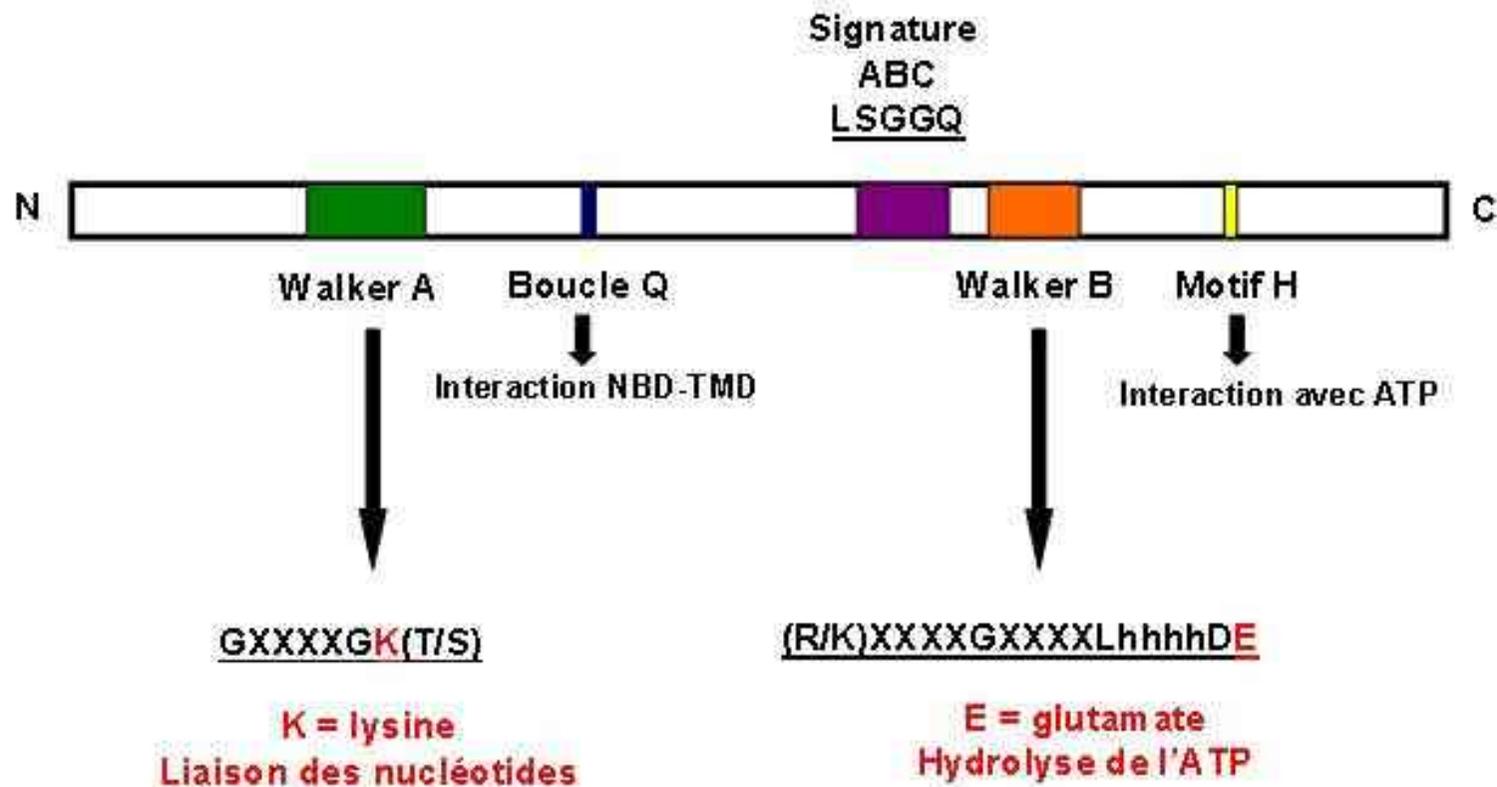
- Présence de Pgp dans les différents stades de nématodes
- Rôle des Pgp dans le transport des anthelminthiques (lévamisole, benzimidazoles & lactones macrocycliques) et la résistance

Structure des glycoprotéines P

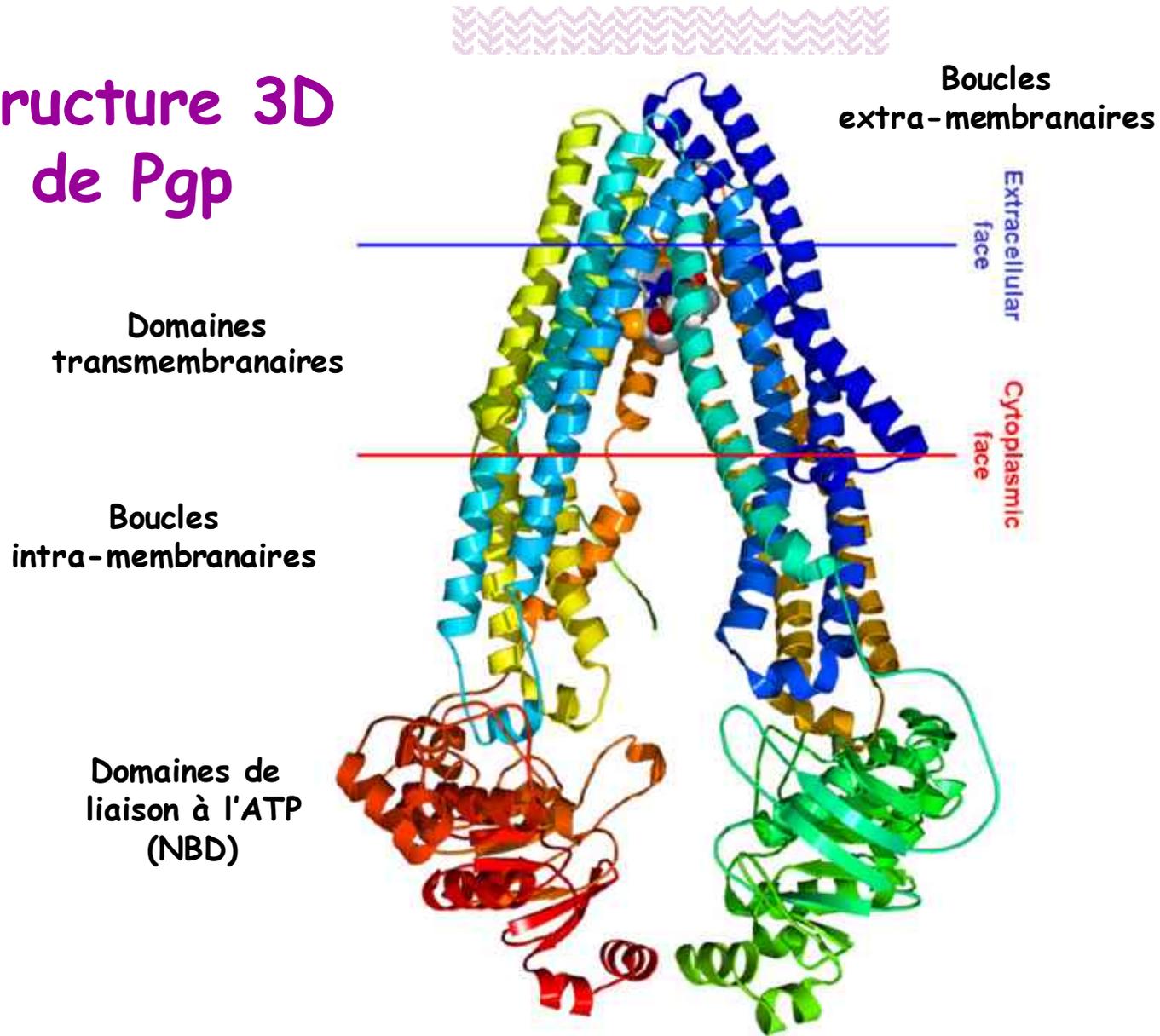


Transporteurs ABC = présence d' "ATP-Binding Cassettes"
(« Nucleotides Binding Domains », NBD)

Cassette de liaison à l'ATP « Domaine ABC »



Structure 3D de Pgp





Mise en évidence de Pgp chez les nématodes

6 octobre 2011 AVF, Paris

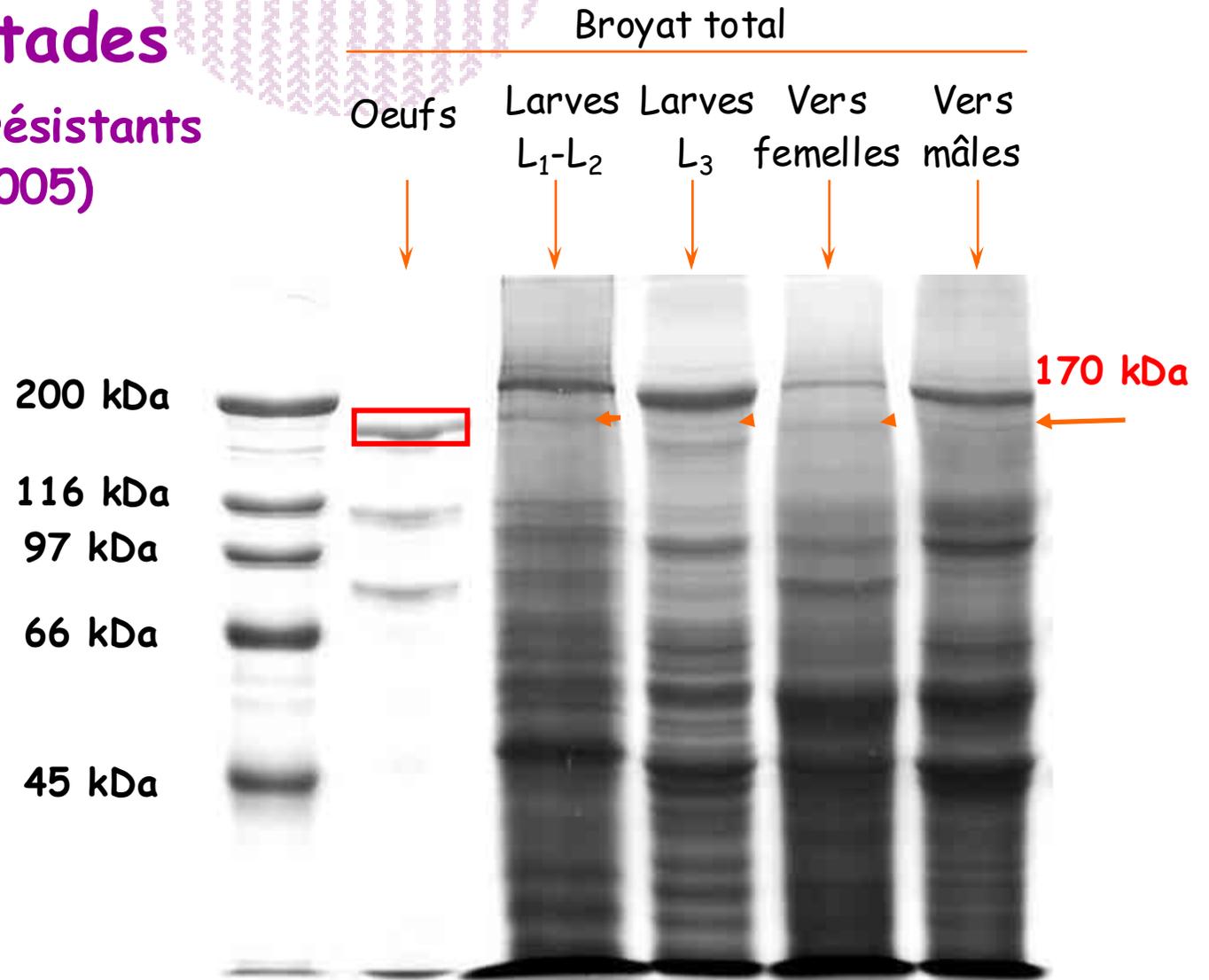
12

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

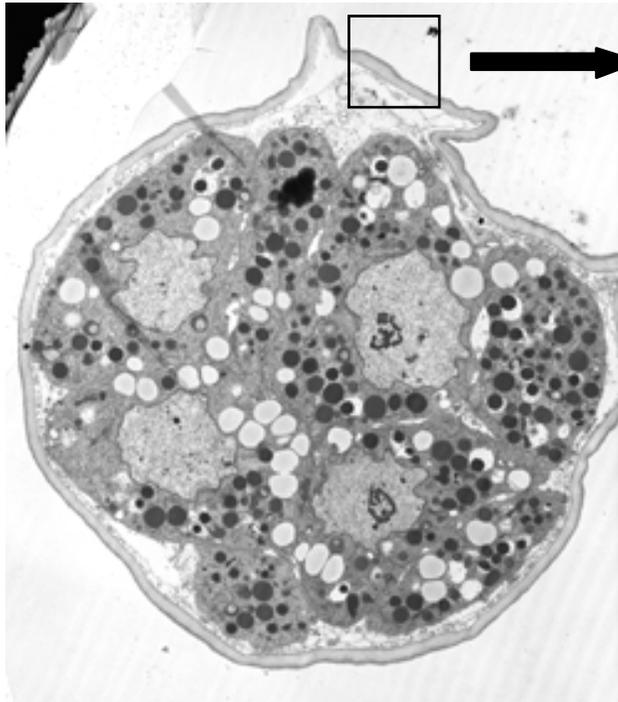
INRA

Présence de Pgp aux différents stades

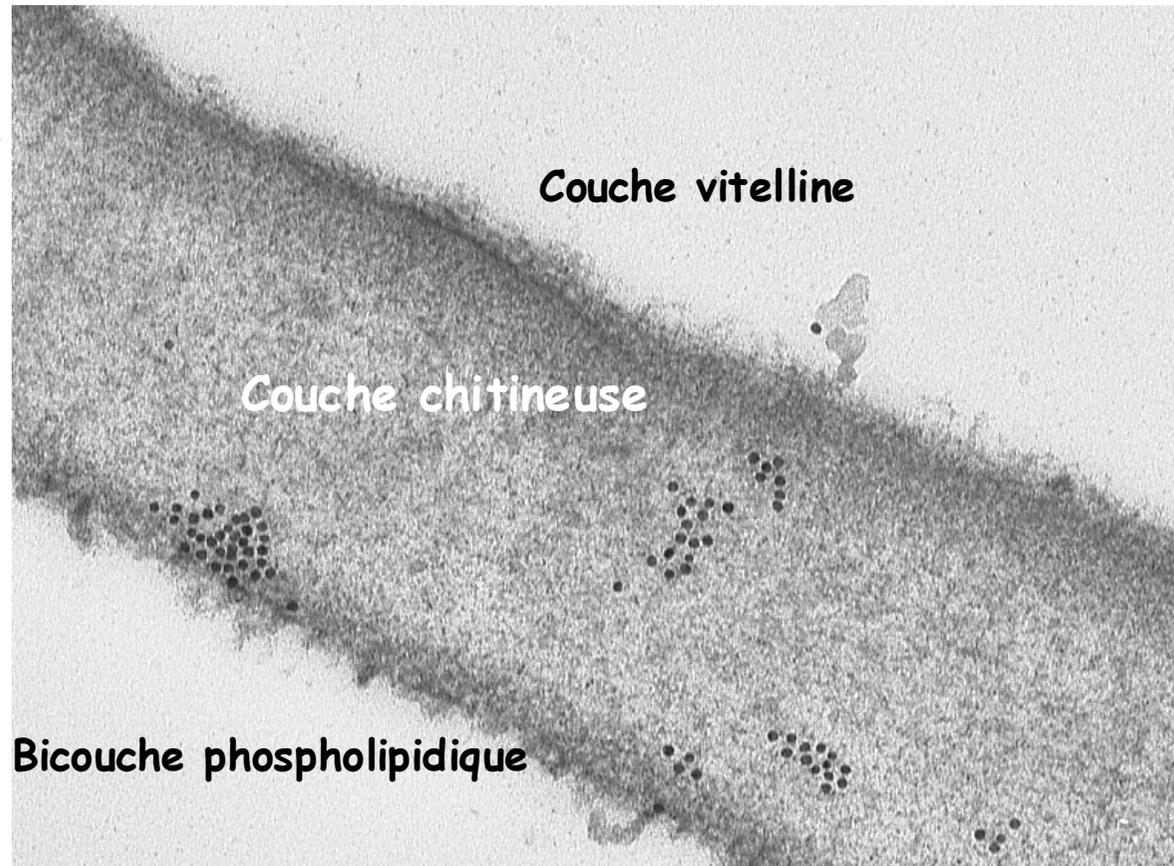
Ex. *H. contortus* résistants
(Riou *et al*, 2005)



Clone F4 : localisation des Pgp Coques des œufs d' *H. contortus*



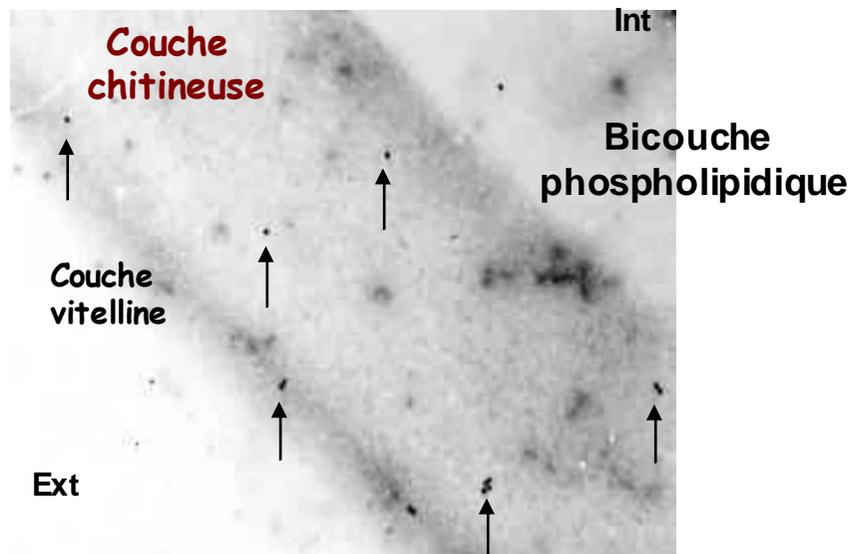
Riou *et al*, 2003



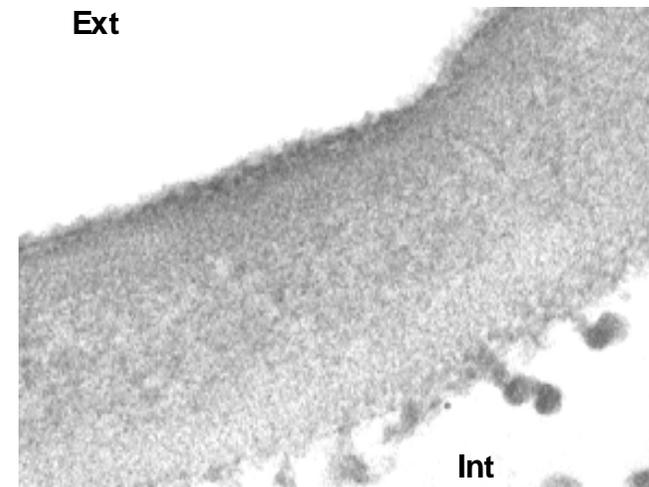
Immunogold anti-Pgp (clone F4)

Présence de Pgp actives (clone UIC2) dans les coques des œufs

UIC2



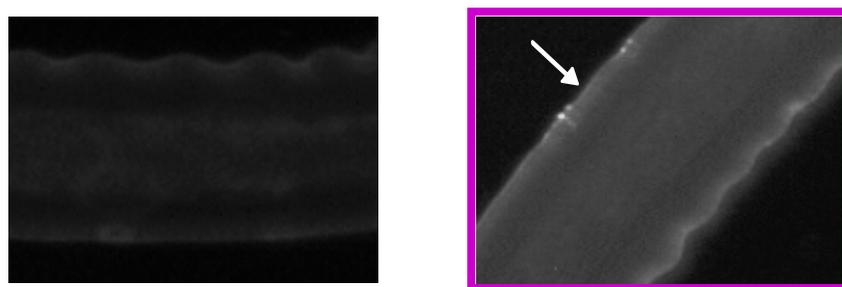
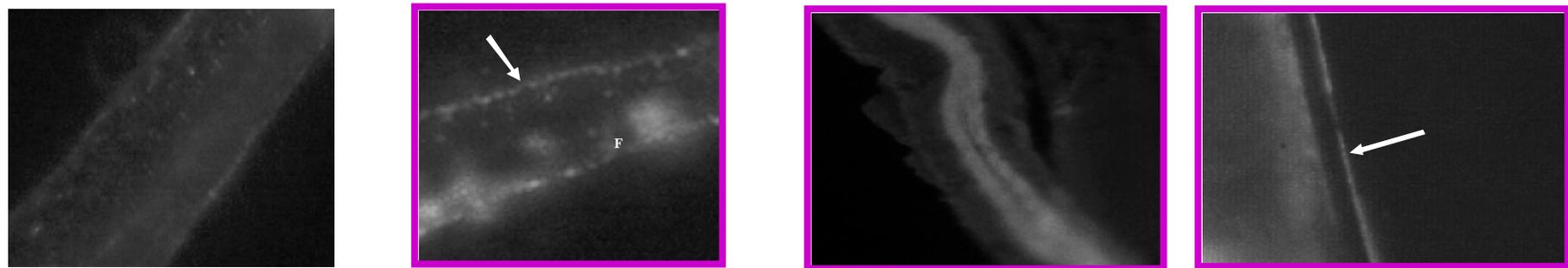
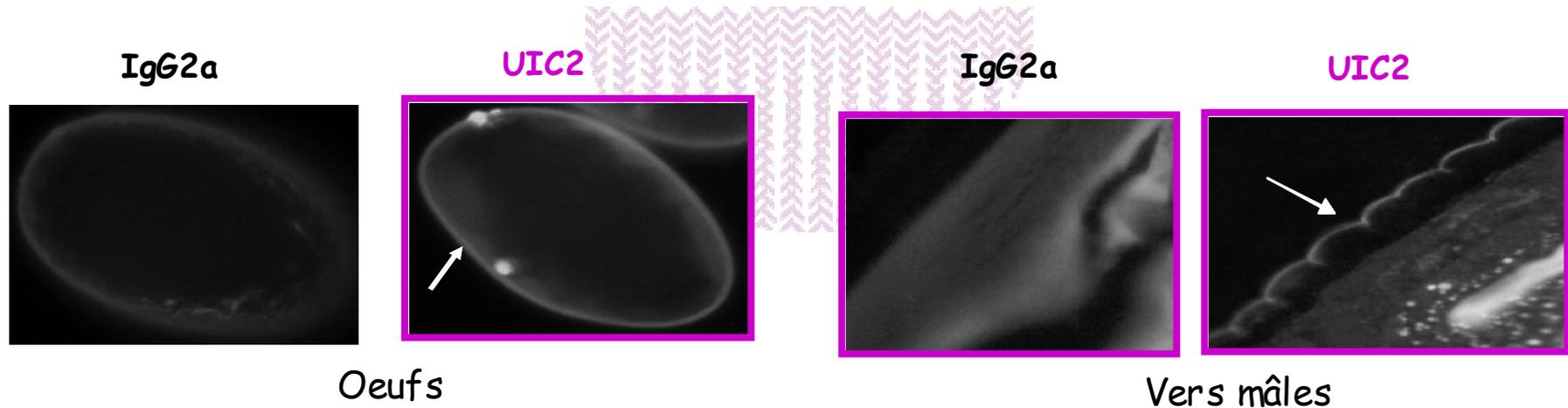
Isotype



(Riou *et al*, 2005)

Immunogold anti-Pgp (clone UIC2)

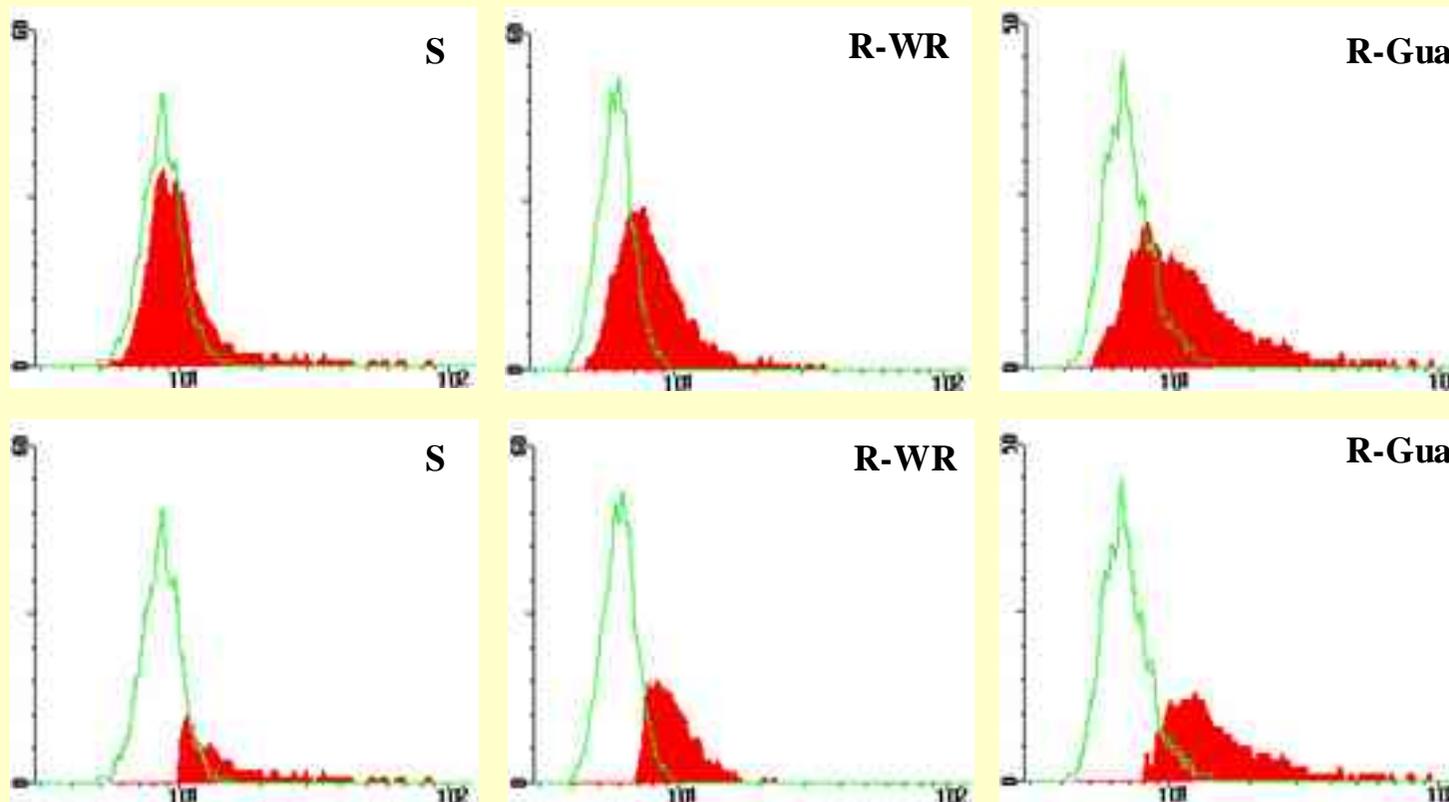
X 21 000



Détection des Pgp actives par immunofluorescence

Riou et al. 2005

Anticorps anti Pgp (MDR1), analyse en cytométrie Œufs d'*Haemonchus contortus*



Vert = Témoins isotype
Rouge = marqués UIC2



**Analyse des Pgp d' *Haemonchus contortus*
Spectrométrie de masse**

**Deux isolats (un sensible et un résistant)
Peptides recherchés dans différents domaines**

Total = 13 peptides identifiés et comparés

Plusieurs peptides sont spécifiques des nématodes



4 spécifiques
d'*H. contortus*



6 communs avec
Caenorhabditis



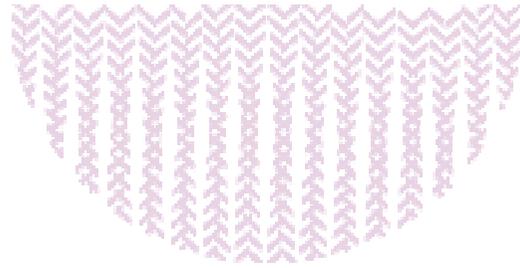
4 communs avec
Mus musculus



1 commun avec
Ovis aries



3 communs avec
Homo sapiens



Activité de transport

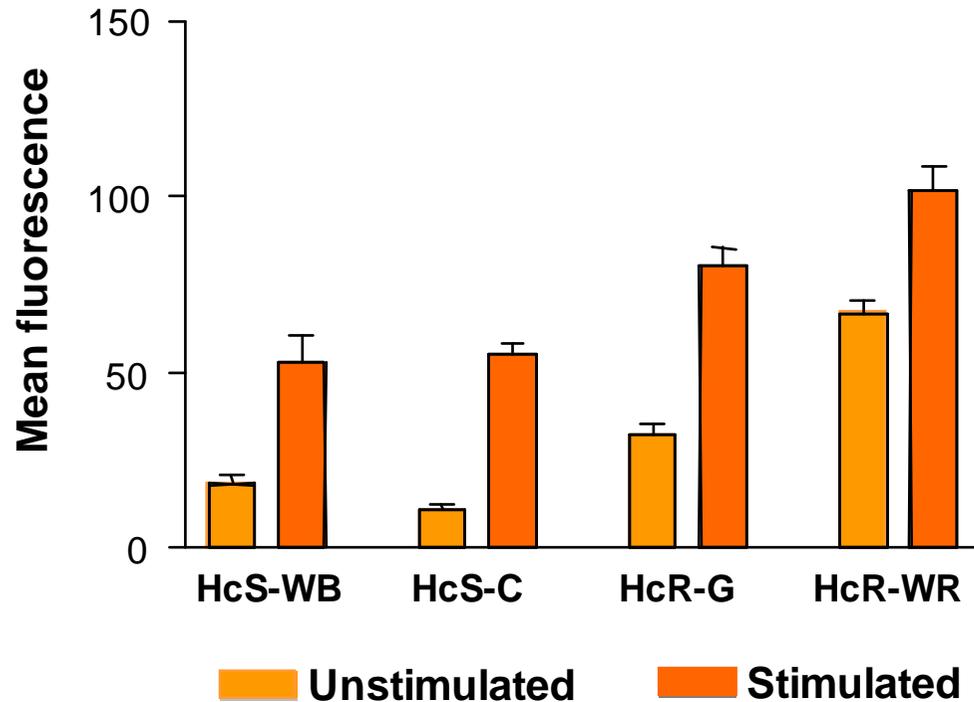
6 octobre 2011 AVF, Paris

20

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Nombre et activité des Pgp Oeufs d'*H. contortus*



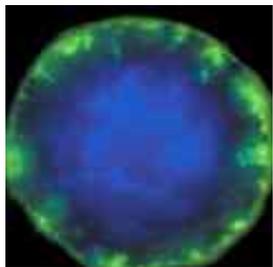
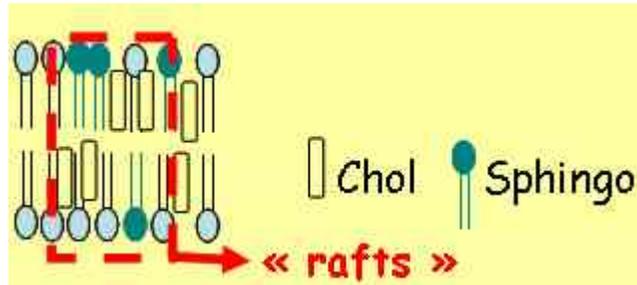
➤ Pgp activées marquées par UIC2 couplés phycoérythrine

➤ Les isolats résistants ont plus de pompes que les isolats sensibles.

➤ La stimulation par un substrat de Pgp augmente le nombre de Pgp actives.

Kerboeuf et al, 2003

Mise en évidence de « rafts »

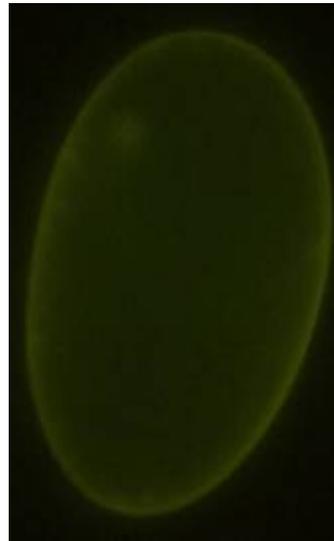


Rafts
(macrophage)

1 μm

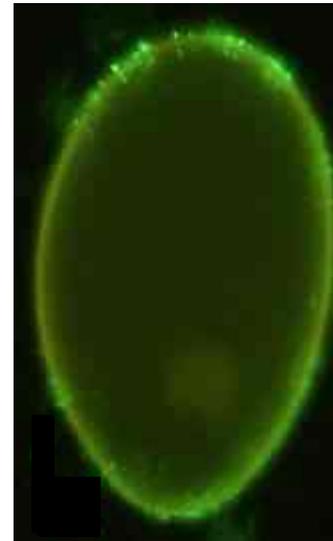
Molecular Probes®

Témoin

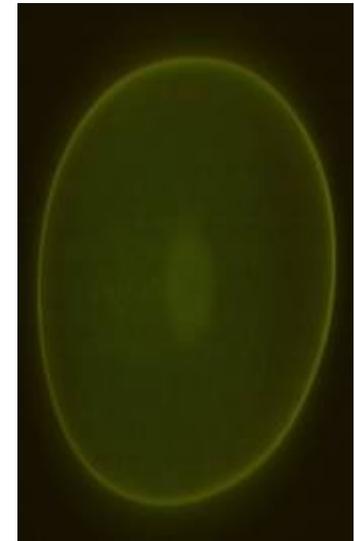


10 μm

ToxAc1Ac2

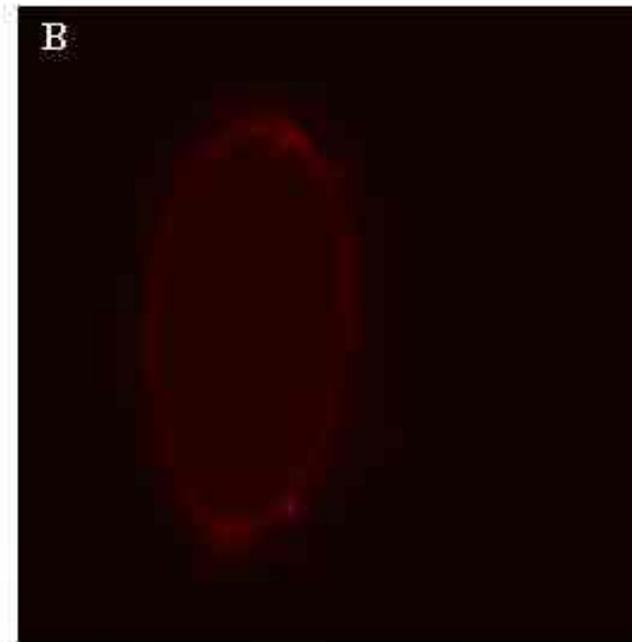
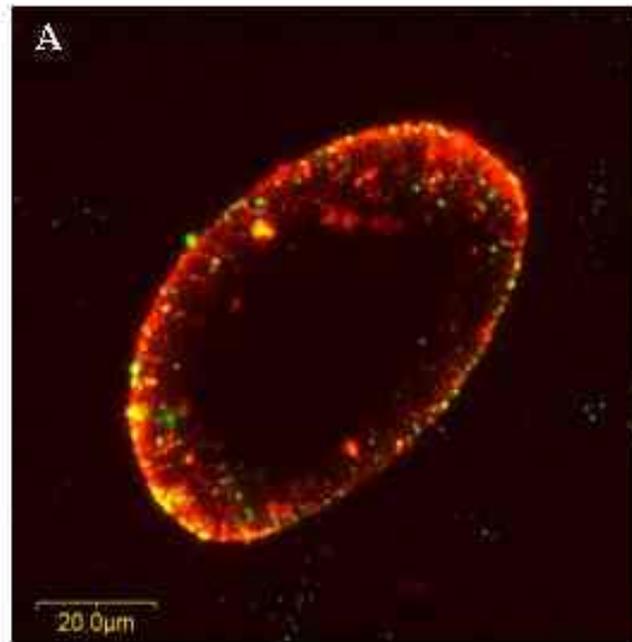


MBCD ToxAc1Ac2



Rafts dans la coque des œufs
d'*Haemonchus contortus*

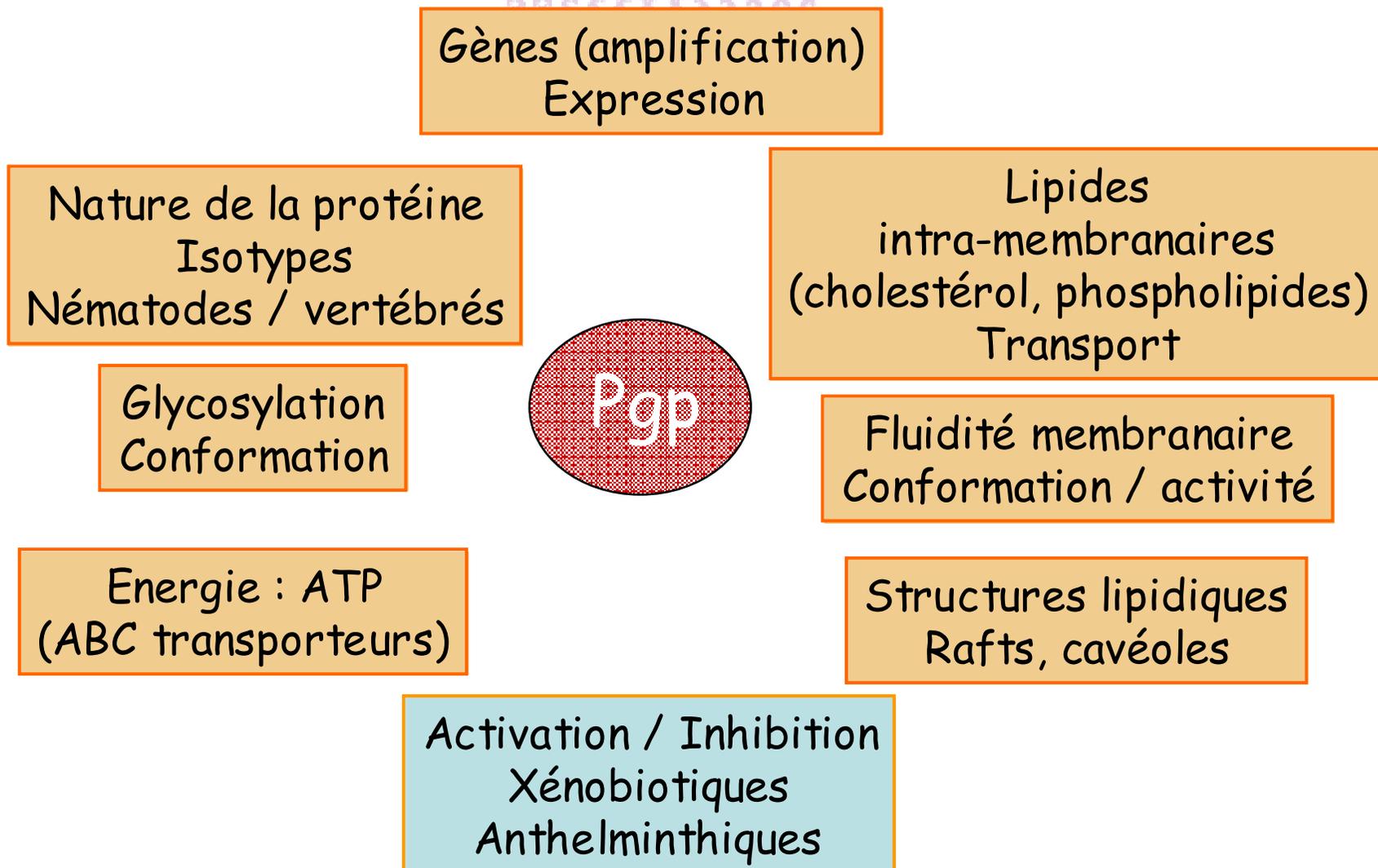
Colocalisation « rafts » - Pgp



-  Rafts
-  P-gp marquées par 4E3
-  Colocalisation Rafts / P-gp

Témoin isotype

Pgp et résistance aux anthelminthiques





Inhibition de l'efflux

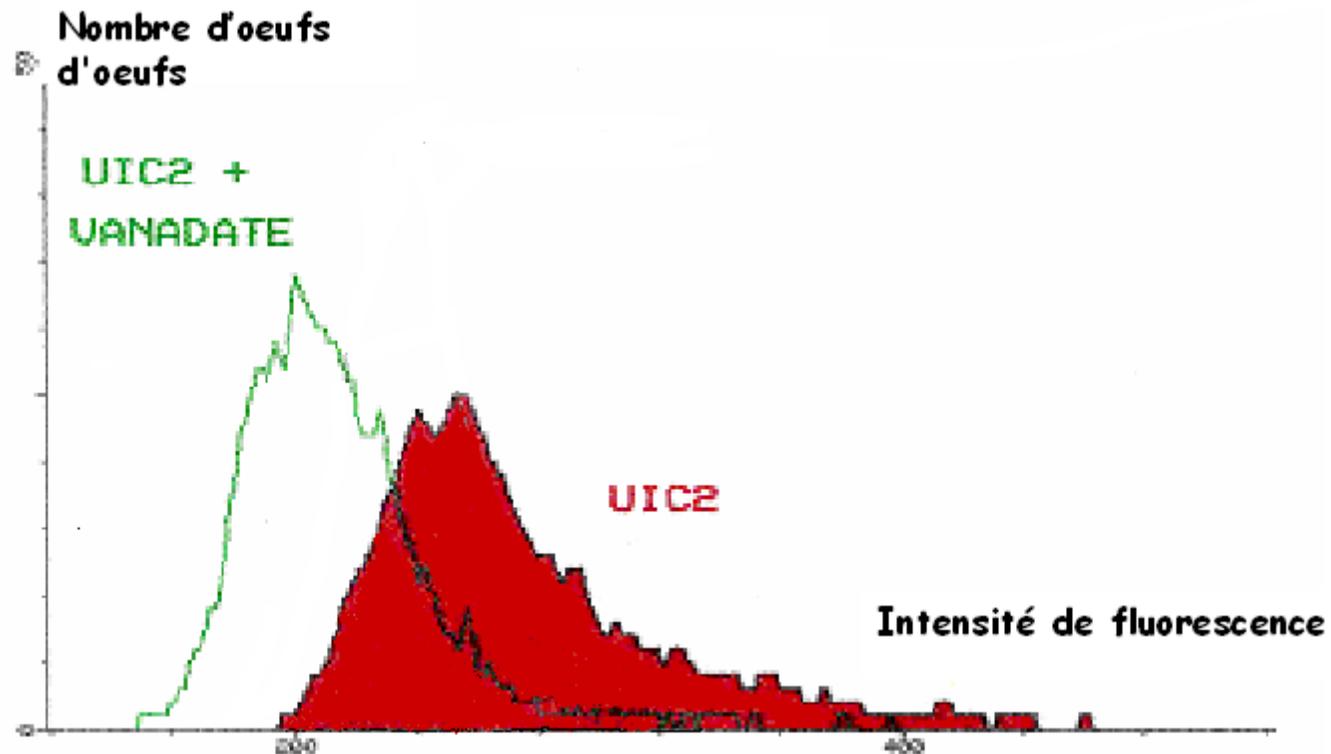
6 octobre 2011 AVF, Paris

25

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

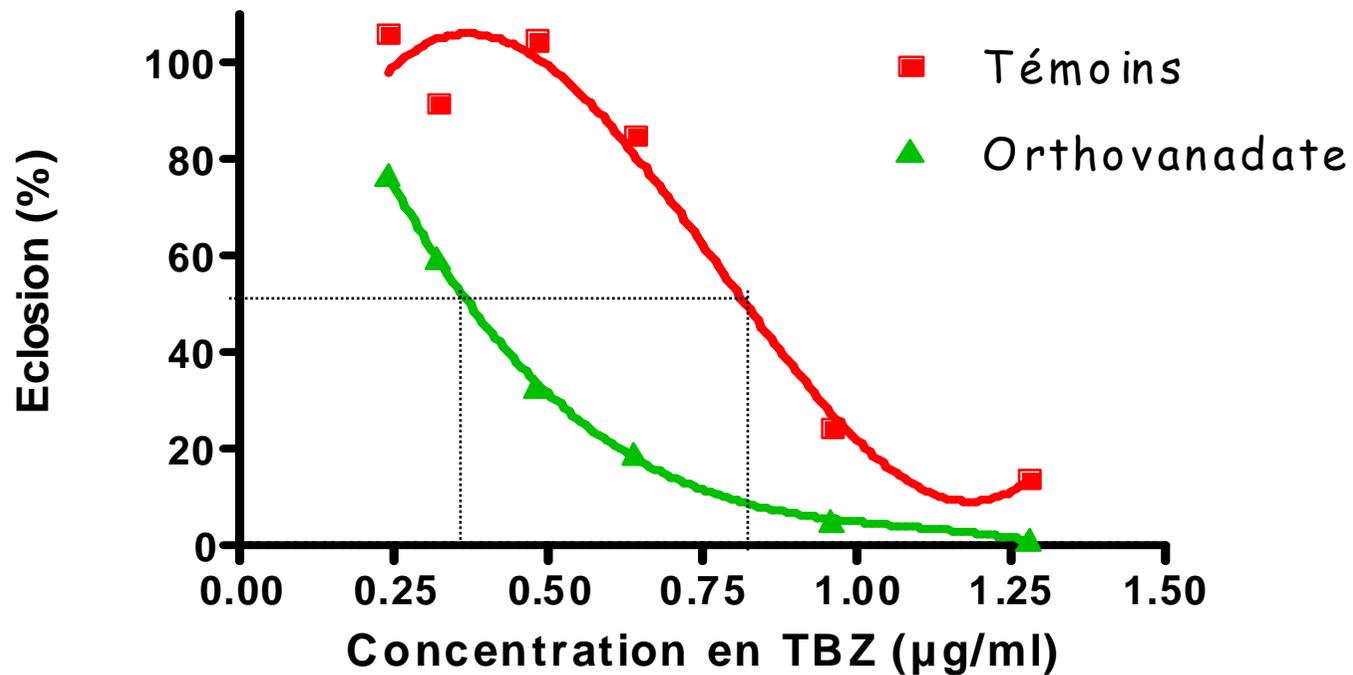
INRA

L'orthovanadate de sodium réduit le nombre de Pgp actives (UIC2)



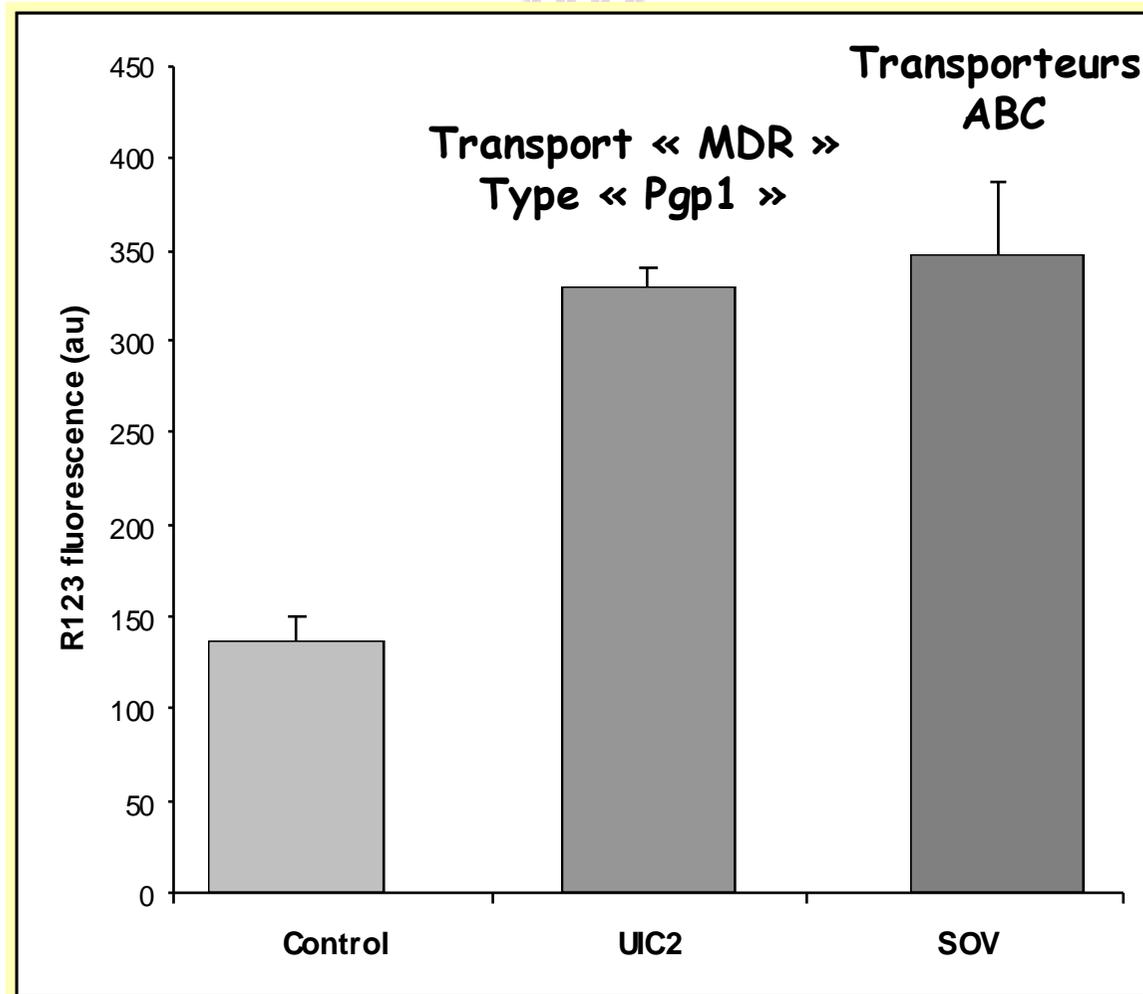
Analyse en cytométrie en flux

L'orthovanadate de sodium réduit la résistance aux anthelminthiques



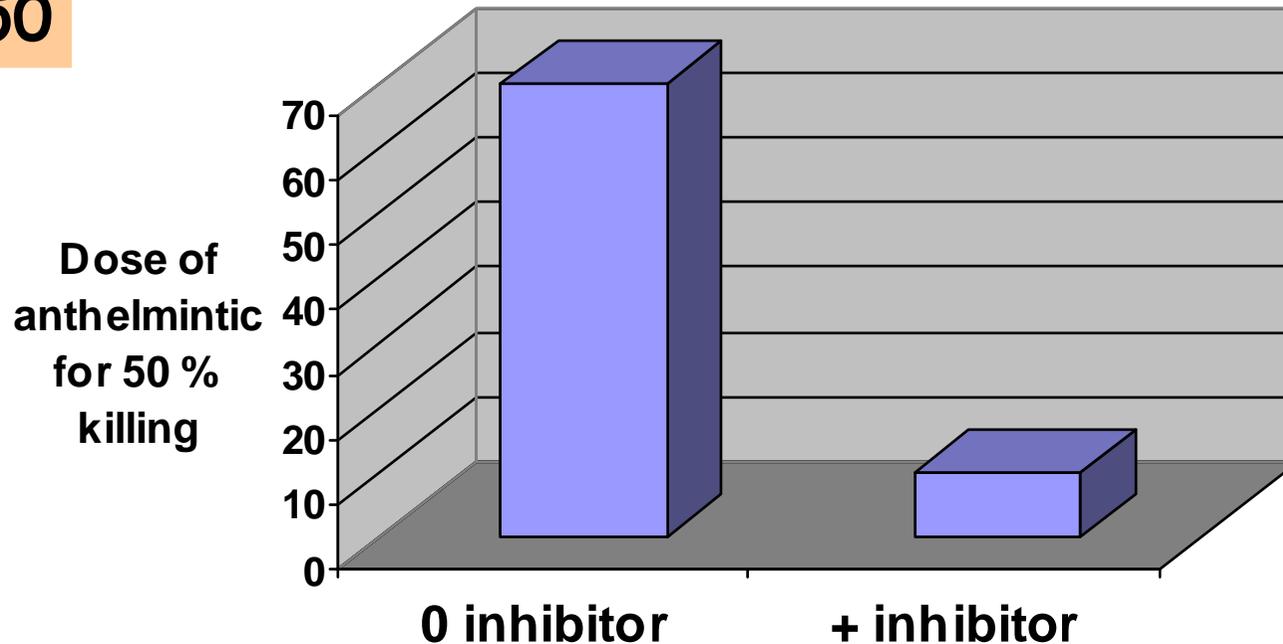
(ex. Thiabendazole)

Spécificité du transport : l' UIC2 bloque l'efflux de la rhodamine 123



Le vérapamil augmente la toxicité des anthelminthiques

DL50

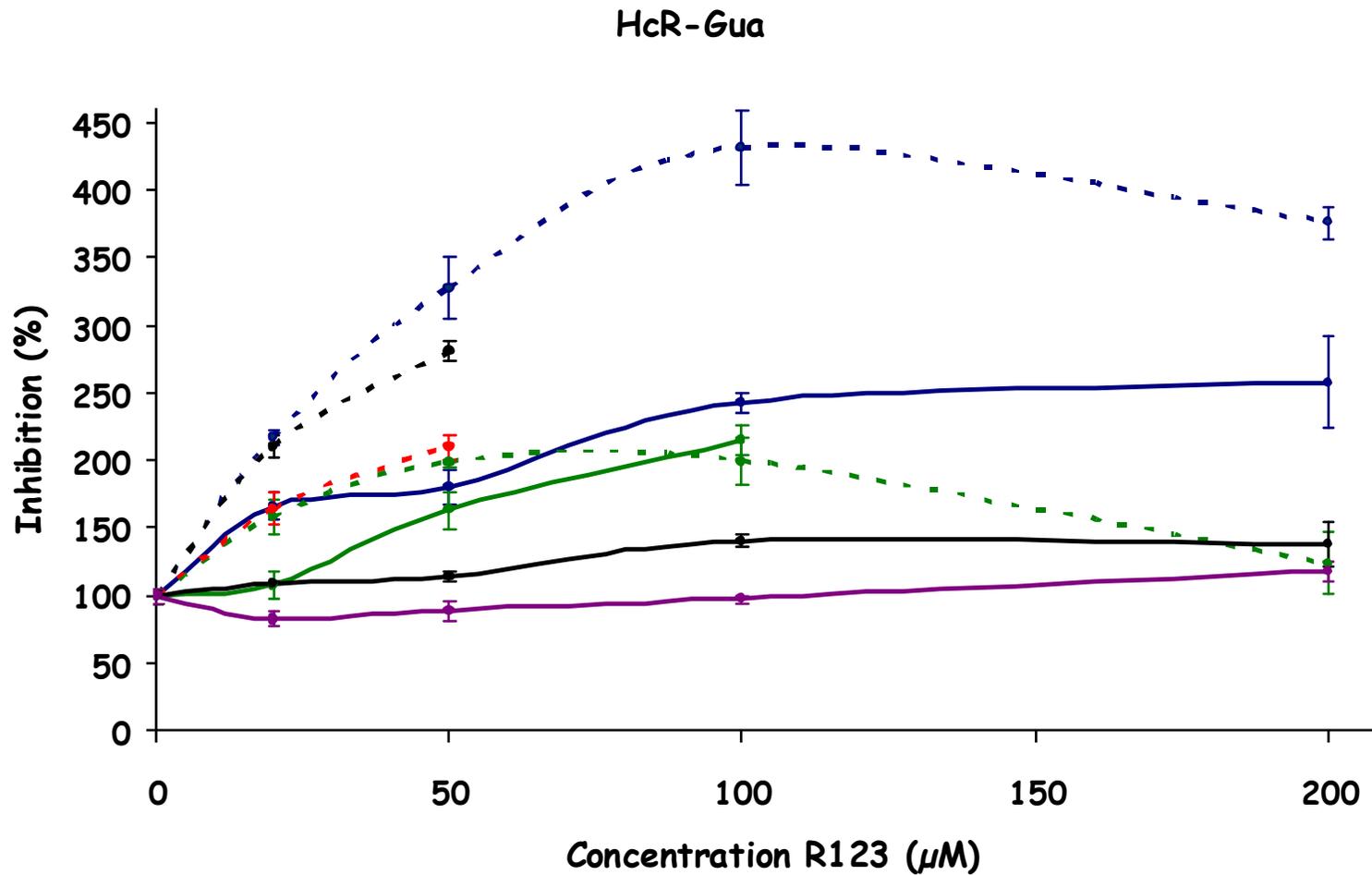


Avec le **vérapamil** : effect de l'anthelminthique x 7

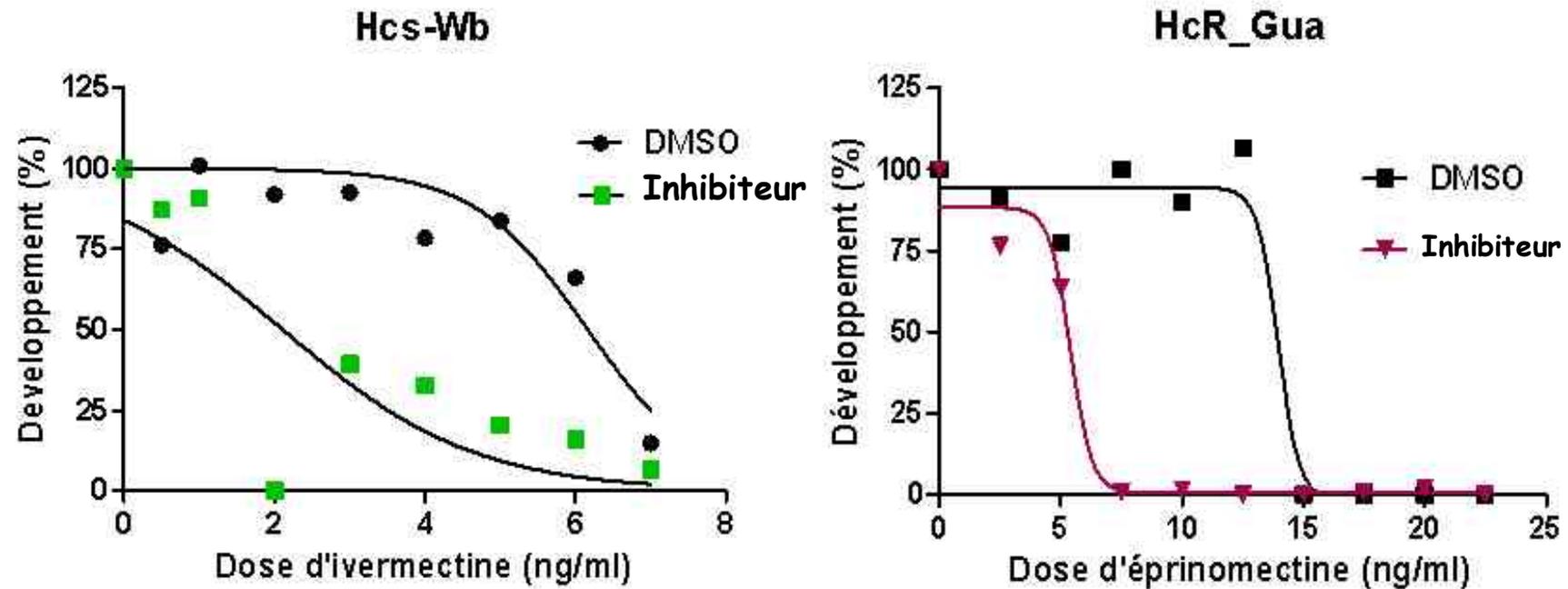
Mais besoin d'inhibiteurs moins toxiques pour l'hôte

Inhibiteurs :

(1) Tests rhodamine 123

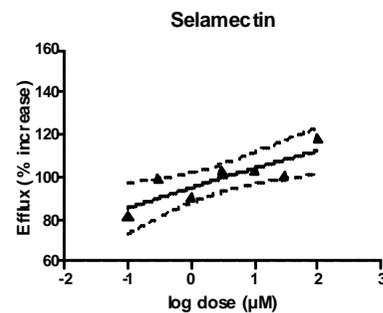
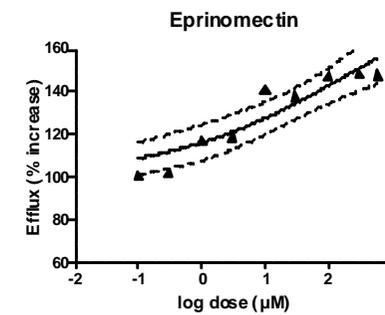
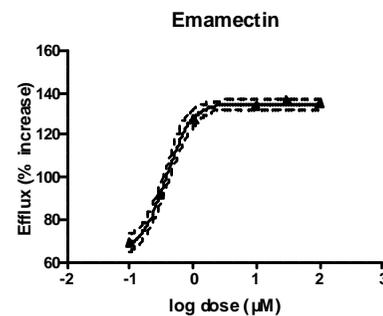
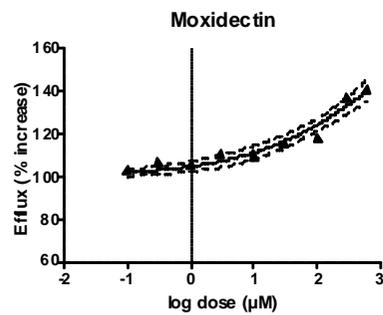
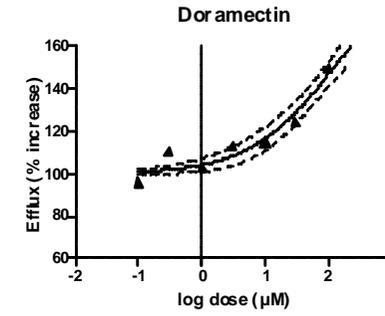
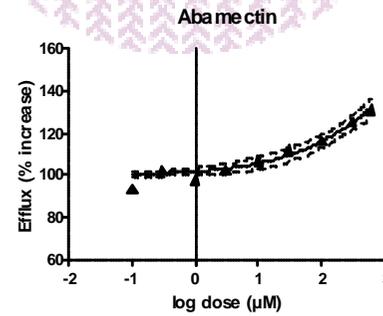
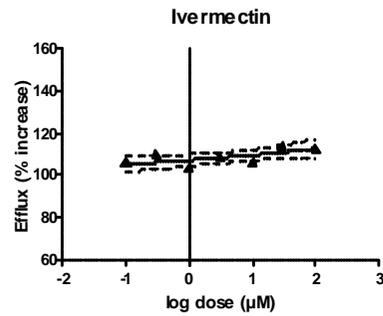


(2) tests *in vitro* avec anthelminthiques



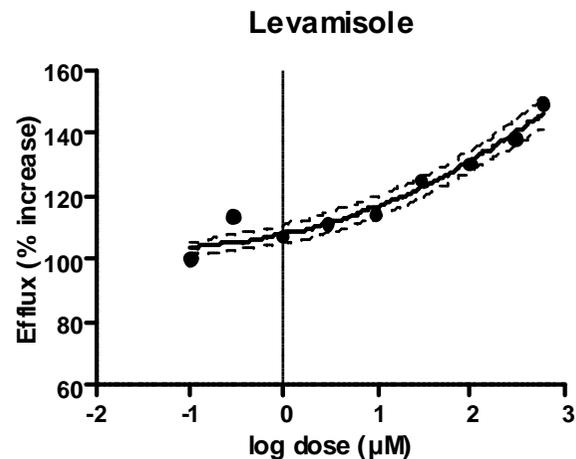
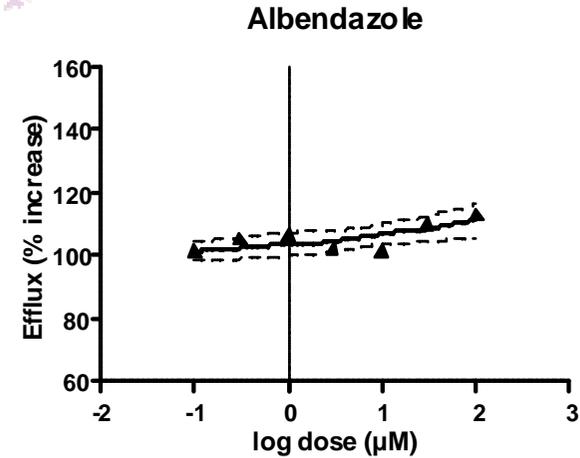
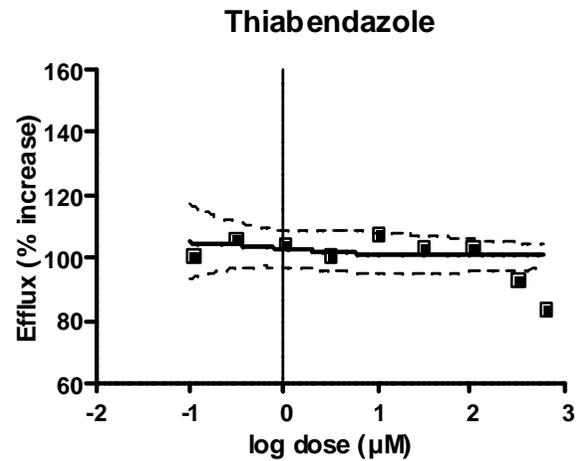
1. Les inhibiteurs augmentent l'efficacité des anthelminthiques
2. Effets observés chez les sensibles & les résistants

Effet des anthelminthiques sur l'efflux (1)



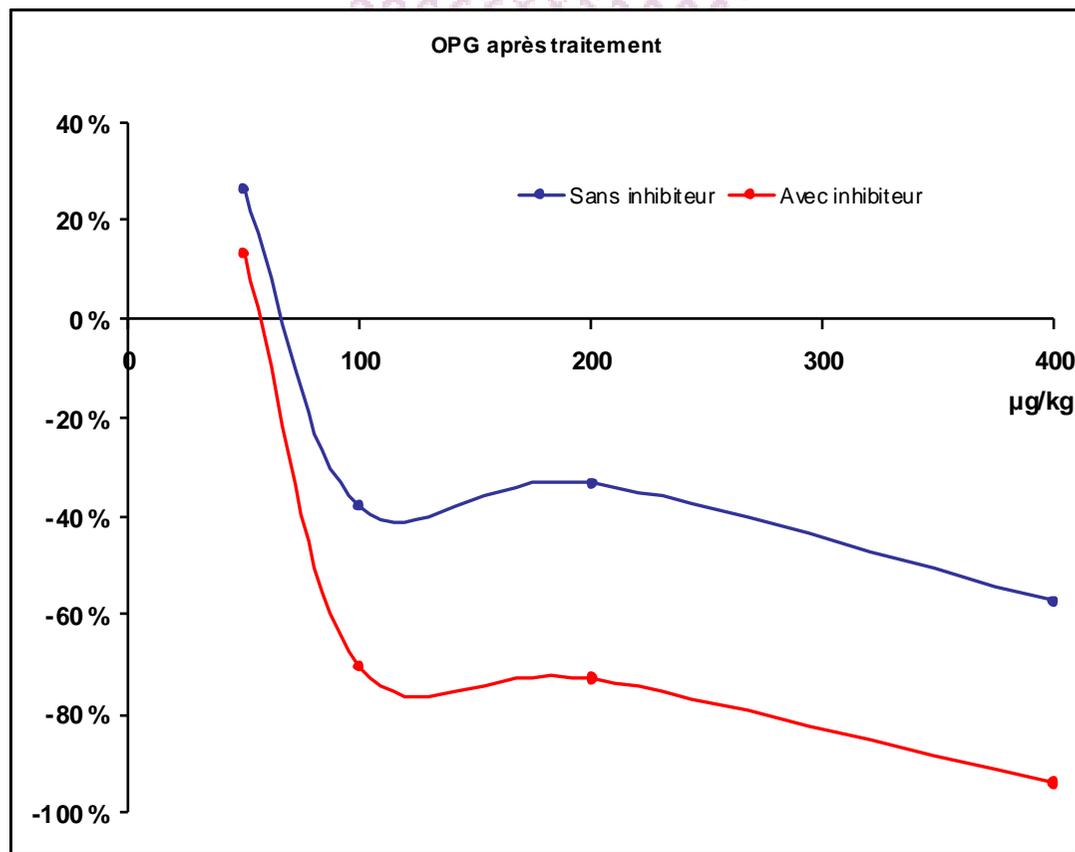
Kerboeuf et al., 2010

Effet des anthelminthiques sur l'efflux (2)



Kerboeuf et al., 2010

in vivo ...



**Augmentation de 40 % de l'efficacité
= près de 100 % réduction de la charge parasitaire**

Nouveaux inhibiteurs

- Activité > vérapamil
- Activité proche de l'orthovanadate de sodium
- Faible toxicité pour les vertébrés
- Spécificité pour les nématodes



Brevet déposé en juin 2010

Les participants

- Dominique Kerboeuf (DR Inra, UR IASP)
- Mickaël Riou (Thèse 2001-2005, Ingénieur Inra PFIE)
- Zoubida Zekkal (Master 1 2003-2004, Université Tours)
- Ludovic Mantin (Master 1, 2006-2007, Université Tours)
- Marie Fassot-Garnier (Master 2 et thèse 2006-2008)
- Mohamed Issouf (Master 2 et thèse 2009-2012)
- Fabrice Guégnard (TR Inra UR IASP, DEST Sciences pharmacologiques)
- Christine Koch (TR Inra IASP)
- Yves Le Vern (AI Inra IASP Cytométrie)
- Personnel de la PFIE (Inra Nouzilly)





AVF, 6 octobre 2011, Paris

37

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA