

# LA MAITRISE DES POMPES D'EFFLUX, UN PROGRES DANS LA LUTTE CONTRE LES NEMATODES PARASITES

## *EFFLUX PUMP INHIBITORS: A PROGRESS IN PARASITIC NEMATODE CONTROL*

Par Dominique KERBOEUF<sup>1</sup> et Mickaël RIOU<sup>2</sup>  
(Mémoire présenté le 6 octobre 2011)

### RÉSUMÉ

Les anthelminthiques constituent le moyen majeur de lutte contre les nématodoses animales et humaines. Administrés de façon continue en période d'infestation, ils représentent un coût considérable pour les élevages. Chez l'homme, ce coût limite leur distribution dans les zones géographiques défavorisées où pourtant les vers parasites sont les plus nombreux et les plus pathogènes. De plus, les nématodes ont développé des mécanismes de chimiorésistance, spécifiques ou non, qui réduisent l'efficacité des anthelminthiques. Parmi ces mécanismes, le rejet accéléré des molécules thérapeutiques par des pompes d'efflux est semblable au mécanisme de multi-résistance aux médicaments (MDR) des cellules cancéreuses et des protozoaires. Ces pompes sont présentes dans les membranes cellulaires, la coque des œufs et les cuticules des nématodes. Ce rejet accéléré est d'autant plus préoccupant qu'il s'applique simultanément à plusieurs familles chimiques d'antiparasitaires. Une des solutions consiste à bloquer les pompes d'efflux des parasites à l'aide d'inhibiteurs. Ces pompes appartiennent à la grande famille des transporteurs ABC dotés de nombreuses caractéristiques communes. Certains de ces transporteurs jouent des rôles physiologiques déterminants ou protègent les organes des molécules toxiques. Les inhibiteurs doivent donc être autant que possible dépourvus d'action sur les pompes de l'hôte. La variabilité des pompes est plus importante chez les nématodes que chez les vertébrés, et il existe des différences dans leur structure protéique. Certaines parties de ces protéines sont bien conservées dans le règne animal, tandis que d'autres présentent peu d'homologie d'un transporteur à l'autre ou, pour un même transporteur, d'une espèce à l'autre. L'affinité de ces pompes pour les substrats peut varier en fonction de la mutation d'un seul acide aminé. Ces différences pourraient être mises à profit pour développer des inhibiteurs spécifiques des pompes des nématodes et les utiliser en association avec les anthelminthiques.

**Mots-clés :** nématodes, anthelminthiques, résistance aux médicaments, pompes d'efflux, inhibiteurs, transporteurs ABC.

(1) INRA, UR 1282, IASP-213, 37380 Nouzilly, France, [kerboeuf@tours.inra.fr](mailto:kerboeuf@tours.inra.fr)

(2) INRA, UE 1977, Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE), 37380 Nouzilly, France, [Mickaël.Riou@tours.inra.fr](mailto:Mickaël.Riou@tours.inra.fr)

**SUMMARY**

*Animal and human nematode infestations are controlled primarily with anthelmintics. However, their continuous administration during outbreaks represents a significant expense for livestock farms. In humans also, their high cost limits their use in poor areas where parasitic worms are most prevalent and most pathogenic. Furthermore, nematodes have developed drug resistance mechanisms, specific or not, which reduce the efficiency of treatments. Among these mechanisms, the accelerated removal of anthelmintics by efflux pumps present in cell membranes, eggshells and cuticles is a major limiting factor. This accelerated efflux is very similar to the mechanism of multidrug resistance (MDR) observed in cancer cells and protozoa. This phenomenon is all the more worrying that it applies simultaneously to several chemical families of drugs. One solution is to block the efflux pumps in parasites with inhibitors. These pumps belong to the large family of ABC transporters, which have many characteristics in common. Some have major physiological functions or protect organs from toxic agents. As much as possible, inhibitors should not have any effect on the pumps of the host and target the parasite exclusively. The diversity of these pumps is greater in nematodes than in vertebrates, and there are differences in their protein structures. Some parts of these proteins are relatively well-conserved in the animal kingdom, while other parts show little homology from one transporter to another or from one species to another. The affinity of these pumps for the substrates can vary with the mutation of a single amino acid. These differences could be used to develop inhibitors specific of nematode pumps, which could then be combined with anthelmintics.*

**Key words:** nematodes, anthelmintics, drug resistance, efflux pumps, inhibitors, ABC transporters.

## INTRODUCTION : ÉTAT ACTUEL ET LIMITES DES MOYENS DE LUTTE CONTRE LES NÉMATODES PARASITES

Les nématodes parasites sont la cause de nombreuses parasitoses à l'origine de graves problèmes de santé tant chez l'animal que chez l'homme. En élevage, les pertes économiques associées, directement ou indirectement, à la présence de ces parasites sont très élevées (Johnston *et al.* 2009). La lutte contre les nématodes repose essentiellement sur l'utilisation d'agents thérapeutiques antiparasitaires ou plus précisément d'anthelminthiques. D'autres méthodes prophylactiques, comme la sélection d'animaux génétiquement résistants, la lutte biologique contre les stades libres de ces parasites, la mise au point de vaccins, ont été recherchées avec un succès mitigé (Sayers & Sweeney, 2005; Jackson & Miller, 2006). Aucune de ces méthodes ne permet actuellement de se passer du traitement anthelminthique.

Les anthelminthiques, très efficaces lors de leur mise sur le marché, présentent cependant plusieurs inconvénients : leur coût relativement élevé, surtout pour les molécules les plus efficaces, la relative toxicité de certains d'entre eux pour le consommateur, l'éventuel impact sur l'environnement et les contraintes associées à leur utilisation comme le respect de temps d'attente chez les animaux dont le lait ou la viande sont destinés à la consommation ou le temps passé à traiter les animaux. L'un des plus graves des inconvénients liés à l'utilisation répétée de ces médicaments est le développement, généralement progressif, d'une résistance des nématodes à ces molécules (Jackson & Miller, 2006).

Cette résistance est due à plusieurs types de mécanismes, parfois associés, dont certains affectent plusieurs familles chimiques

en même temps. Certaines voies sont proches de celles impliquées dans les phénomènes de détoxication chez les vertébrés. La difficulté est donc grande pour l'industrie pharmaceutique à identifier de nouvelles familles chimiques dont les molécules seraient actives vis-à-vis des nématodes résistants à d'autres groupes chimiques. Jusqu'à présent, peu de découvertes ont été réalisées dans ce domaine. Il est probable, qu'à plus ou moins long terme, selon les modalités d'utilisation de ces médicaments, la proportion de parasites résistants continue de s'étendre dans les populations de nématodes (von Samson-Himmelstjerna & Blackhall, 2005). Il est donc indispensable de disposer de moyens de neutralisation des systèmes de défense des parasites envers les agents thérapeutiques. Cette stratégie requiert une bonne connaissance des mécanismes en jeu et la sélection d'inhibiteurs sans effets néfastes pour l'hôte et l'environnement.

## MÉCANISMES DE CHIMIORÉSISTANCE CHEZ LES EUCARYOTES

### Différents mécanismes

Dans tout le règne vivant, les chimiorésistances associent des mécanismes spécifiques et non spécifiques mis en jeu, conjointement ou non, pour échapper aux effets éventuellement délétères des xénobiotiques auxquels les organismes vivants sont confrontés. Ces xénobiotiques englobent toutes les substances étrangères à la cellule ou à l'organisme considéré. La **figure 1** résume le cheminement d'un xénobiotique dans une cellule eucaryote et indique les principaux mécanismes utilisés par la cellule pour en réduire la toxicité et développer une résistance.

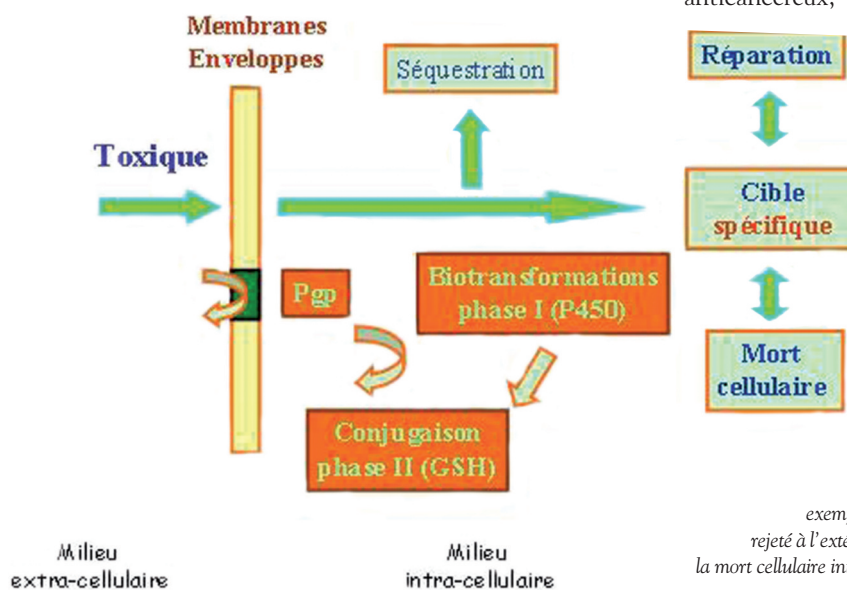
Les mécanismes spécifiques correspondent à des mutations de la ou des cibles intra-cellulaires où le xénobiotique va se fixer

une fois entré dans la cellule. De cette fixation résulte le plus souvent un effet toxique. La plupart des xénobiotiques faisant l'objet d'une résistance spécifique reconnue sont des médicaments. Les cibles possibles sont nombreuses et elles ne sont pas toujours bien identifiées. Une ou plusieurs mutations peuvent conférer la résistance. L'identification de ces mutations est primordiale pour établir un diagnostic de résistance et pour trouver des moyens de la contourner. Cette recherche est très difficile car de nouvelles mutations peuvent apparaître au cours du temps dans une population de parasites. De plus, tous les individus d'une même population ne possèdent pas toujours le même type de mutation.

Quant aux résistances non spécifiques, elles s'appliquent à toutes sortes de composés, de nature chimique très variée, qui ont généralement pour principal point commun d'être des substances lipophiles. Elles mettent en jeu des systèmes qui empêchent la pénétration du xénobiotique ou qui le rejettent rapidement après son entrée dans la cellule ou l'organisme. Ces mécanismes de rejet ou « efflux » conduisent au phénotype de résistance multiple (MDR pour *MultiDrug Resistance*) par lequel la cellule devient résistante non seulement au xénobiotique initial mais en même temps à d'autres molécules plus ou moins apparentées chimiquement.

### Rôle de l'efflux dans les chimiorésistances

Bien que plusieurs mécanismes soient le plus souvent associés dans la résistance non spécifique aux xénobiotiques tels que la réduction de l'absorption, la capture, la neutralisation, le rôle principal dans ce processus est exercé par les pompes cellulaires d'efflux. Elles sont présentes en plus grand nombre ou sont plus actives dans les cellules ou organismes résistants. Elles capturent et expulsent le xénobiotique hors de la cellule à une très grande vitesse, ne lui laissant généralement pas ou peu le temps d'atteindre ses cibles (ou récepteurs) ni d'y être présent en concentration suffisante pour y exercer un effet toxique.



Ces pompes sont des grosses protéines intra-membranaires dont il existe une grande variété. Elles sont plus ou moins spécialisées dans le transport de certaines catégories de substances chimiques, d'origine biologique ou non. Elles appartiennent à la vaste superfamille des transporteurs ABC, pour *ATP-Binding Cassette*. Ces transporteurs utilisent en effet l'énergie résultant de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter activement des molécules au travers des membranes biologiques.

## LES TRANSPORTEURS ABC

### La superfamille des ABC transporteurs

Les transporteurs ABC sont des protéines très anciennes du point de vue de la phylogénèse. Ils ont été identifiés chez de nombreux organismes, procaryotes et eucaryotes. Ils dériveraient tous d'une protéine ancestrale commune (Saurin *et al.* 1999).

Les fonctions des transporteurs ABC sont multiples. Ils transportent les xénobiotiques à partir de la membrane ou du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule ou vers un compartiment intracellulaire (réticulum endoplasmique, mitochondries, peroxyosomes). Chez les mammifères, ils limitent la pénétration de toxiques dans des organes vitaux comme le cerveau et le placenta (Ambudkar & Gottesman, 1998). Certains possèdent des fonctions physiologiques dans le foie ou les reins, l'intestin, les glandes surrénales et la barrière hémato-méningée, autorisant par exemple l'entrée dans le cerveau de composés biologiques qui ne pourraient y accéder par simple diffusion. Ils transportent des lipides, des stéroïdes ou divers peptides (Ambudkar & Gottesman, 1998; Gottesman *et al.* 2002).

Les transporteurs les plus connus sont :

- les protéines « MDR » comme les P-glycoprotéines (Pgp) et les protéines MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*), responsables de nombreuses chimiorésistances qui limitent considérablement l'efficacité des traitements, en particulier anticancéreux;

**Figure 1 :** Prise en charge d'un toxique par une cellule eucaryote.

Le toxique peut être capturé dès son contact avec la membrane cellulaire (ou les enveloppes des parasites telles que coque de l'oeuf ou cuticule). Dans ce cas, il se lie directement à des « pompes », par exemple des glycoprotéines P, et il est aussitôt expulsé. Il peut aussi traverser la membrane pour rejoindre sa cible spécifique. Sur ce trajet, il peut être séquestré dans des organites ou être transformé par un processus de détoxification en deux phases. Les enzymes de la phase I vont le rendre plus soluble (cytochromes P450 par exemple). Au cours d'une phase II, il est par exemple conjugué au glutathion (GSH). Après ces transformations, il est pris en charge par des pompes d'efflux, par exemple de type MRP (*MultiResistance associated Protein*), et rejeté à l'extérieur de la cellule. Si le toxique atteint malgré tout sa cible, la mort cellulaire intervient sauf si des processus de réparation sont activés.

## MÉMOIRE

- le canal chlorure CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*, ABCC7) dont les mutations sont à l'origine de la mucoviscidose ;
- les transporteurs ABC impliqués dans l'adrénoleucodystrophie (ABCD1) ou des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (ABCA2) ou l'anémie sidérolastique (ABCB7).

### Structure des transporteurs ABC : exemple des P-glycoprotéines

Les protéines ABC sont insérées dans la membrane cellulaire (figure 2). Elles comportent des domaines transmembranaires et des domaines intra-cytoplasmiques dénommés NBD (*Nucleotide Binding Domains*). Ces derniers, responsables de la liaison de l'ATP, sont caractéristiques de cette famille de protéines.

Ces protéines sont classées en sept familles d'ABCA à ABCG en fonction des séquences des gènes correspondants. Chez les vertébrés, les transporteurs principalement impliqués dans les chimiorésistances appartiennent à trois familles ABCB, ABCC, ABCG. Les gènes correspondants surexprimés sont chez l'homme et les rongeurs *ABCB1 /PGP/MDR1*, *ABCC1 /MRP1* et *ABCG2 /MXR/BCRP* (Allen *et al.* 1999).

Les transporteurs ABC sont fonctionnels sous forme de monomères, d'homodimères, d'hétérodimères ou de polymères. Les formes de transporteurs ABC les plus complètes, comme les P-glycoprotéines, présentent deux domaines NBD et deux domaines transmembranaires. Néanmoins, certains ne sont composés que de la moitié de cette structure type et la protéine est soluble, d'autres se dimérisent pour devenir fonctionnels (Klein *et al.* 1999 ; Dean & Allikmets, 2001; Dean *et al.* 2001).

Les domaines NBD de la Pgp sont séparés par environ 90-120 acides aminés. Ils comprennent trois séquences (motifs) :

- les séquences Walker A (G/A-X4-G-K-T/S) et Walker B (R/K-X3-G-X3-L-h4-D), sites de liaison de l'ATP, qui sont présentes dans de nombreuses autres protéines de type ATPases ;
- une séquence C ou «signature» (L-S-X-G-X-R) très spécifique des membres de cette famille et située entre les séquences Walker (figure 3).

Chez l'homme, le Pgp est une protéine de 170 KDa composée de deux sous-unités, chaque ensemble de domaines transmembranaires possédant six hélices  $\alpha$  (Bosch & Croop, 1996; Bradshaw & Arceci, 1998). Ces domaines déterminent le type de molécules transportées. Les structures moléculaires ont surtout été identifiées par analyse génomique.

### Substrats des P-glycoprotéines

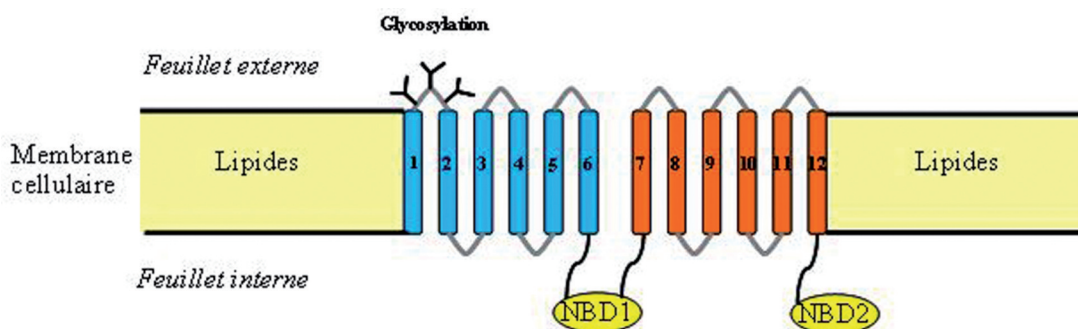
Ces protéines transportent des substances très variées comme des ions organiques et inorganiques, des acides aminés, des peptides, des protéines, des toxines et des médicaments (entre autres antibiotiques et antiparasitaires). Ces molécules entrent passivement dans la bicouche phospholipidique où elles se lient plus ou moins spécifiquement aux domaines transmembranaires des pompes. Elles sont alors expulsées activement (Aller *et al.* 2009). Ce mécanisme de transport est le plus simple identifié dans la famille des ABC transporteurs. D'autres transporteurs, telle que la MRP, nécessitent une conjugaison préalable du substrat avant élimination hors de la cellule ou un co-transport avec le glutathion réduit (Leslie *et al.* 2001).

### Rôle des P-glycoprotéines dans les chimiorésistances

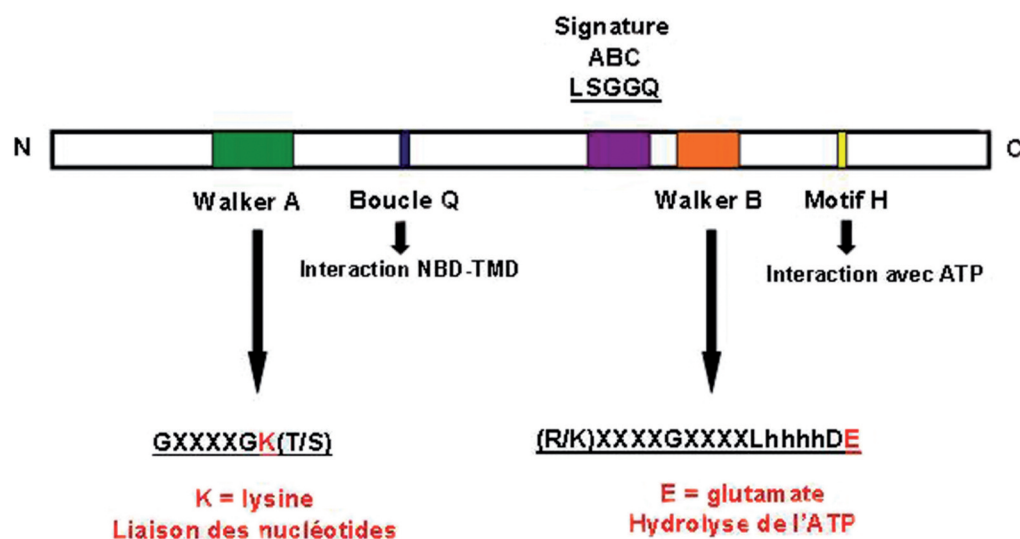
*ABCB1* a été le premier transporteur ABC humain cloné chez l'homme. Ce gène code la protéine P (Pgp) qui confère le phénotype MDR aux cellules cancéreuses (Juliano & Ling, 1976; Riordan *et al.* 1985; Kartner *et al.* 1985; Roninson *et al.* 1986). Le rôle de cette pompe, primordial dans les chimiorésistances, a été largement étudié en cancérologie. Les Pgp transportent un grand nombre de médicaments ou autres substances comme la colchicine, l'étoposide (VP16), l'adriamycine, la vinblastine... Elle affecte ainsi la pharmacologie de ces substances (Hoffmeyer *et al.* 2000).

### Transport des antiparasitaires par les P-glycoprotéines chez les vertébrés

Il a été montré expérimentalement que les Pgp transportent les anthelminthiques chez les vertébrés, assurant ainsi leur rôle de détoxification. Cette fonction a été mise en évidence chez la souris et le chien. Les souris possèdent deux homologues du gène *ABCB1* de l'homme (*Abcb1a*, *Abcb1b*). La délétion des gènes



**Figure 2** : Représentation schématique de la structure d'une glycoprotéine P (Pgp) au sein d'une membrane cellulaire. La protéine est composée de 12 domaines transmembranaires, de deux domaines de liaison à l'ATP (NBD1 et NBD2) et d'un site de glycosylation.



**Figure 3 :** Structure de la cassette de liaison à l'ATP ou domaine ABC.

Le domaine ABC est constitué d'une partie catalytique importante, commune à toutes les ATPases et d'un petit sous-domaine spécifique des transporteurs ABC (motif signature). La partie catalytique comprend les deux boucles Walker A (liaison phosphate) et B (liaison magnésium) ainsi que les motifs Q et H. Cette partie est responsable de la liaison des nucléotides (ATP). La relation entre les séquences protéiques de ces domaines (soulignées) et leurs fonctions a été établie pour plusieurs transporteurs dont la glycoprotéine P humaine.

L = Leucine, S = Sérine, G = glycine, Q = glutamine, K = Lysine, T = thréonine, R = arginine, D = acide aspartique, E = glutamate

X = un acide aminé

H = un acide aminé hydrophobe

NBD = Nucléotide Binding Domain

TMD = Transmembrane Domain

leur confère une sensibilité accrue à une lactone macrocyclique, l'ivermectine, ce qui entraîne une neurotoxicité, en raison de la moindre étanchéité de la barrière hémato-méningée (Schinkel *et al.* 1994; Schinkel *et al.* 1997). Les chiens de race colley, qui présentent naturellement des mutations de leur gène *Mdr1*, sont extrêmement sensibles à l'ivermectine (Mealey *et al.* 2001 ; Hugnet 2005). De même, le blocage des Pgp du vertébré conduit bien à une augmentation de la concentration sanguine et tissulaire des anthelminthiques et donc à une meilleure efficacité du traitement (Lespine *et al.* 2008). Cependant, cet effet s'accompagne pour l'animal d'une toxicité accrue des anthelminthiques et autres xénobiotiques, obstacle à une application thérapeutique de ce principe (Hugnet *et al.* 2007).

## LES P-GLYCOPROTÉINES CHEZ LES NÉMATODES

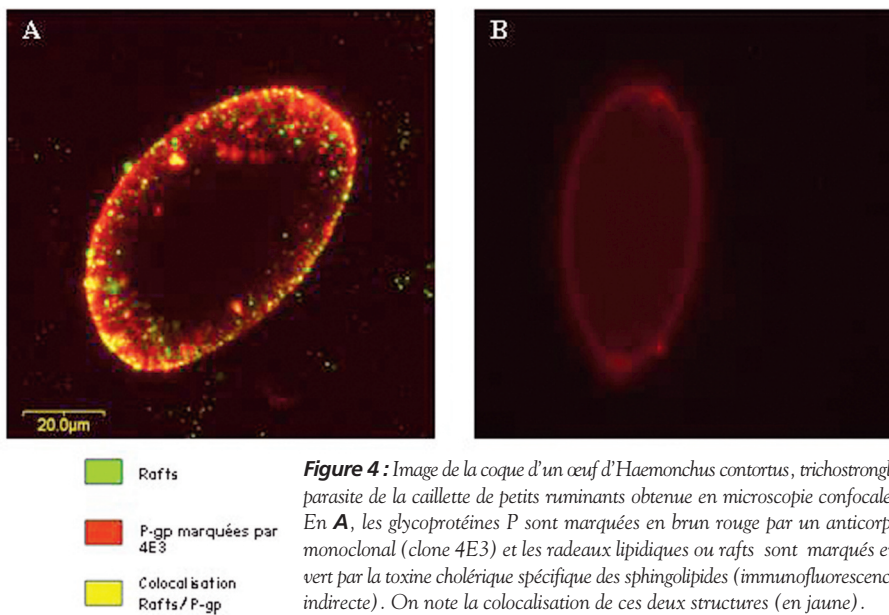
### Mise en évidence des P-glycoprotéines

Des transporteurs de type Pgp sont aussi présents chez les helminthes. Ils ont été particulièrement étudiés chez les nématodes, principalement chez le nématode libre (non parasite) *Caenorhabditis elegans*. La plupart des données portent sur la mise en évidence des gènes correspondants, en grand nombre chez *C. elegans* en comparaison des vertébrés (trois chez l'homme par exemple). Chez les nématodes parasites, d'assez grandes ressemblances sont constatées avec *C. elegans*, au moins du point de vue génomique. Les fonctions des protéines correspondantes sont loin d'avoir été toutes identifiées. Les rapproche-

ments avec les P-glycoprotéines de vertébrés sont délicats du fait de la nomenclature spécifique utilisée pour les nématodes. Ainsi, la Pgp 2 de *C. elegans* jouerait à peu près le même rôle dans les mécanismes de détoxication que la Pgp 1 des mammifères. Le rôle de certaines Pgp présentes chez les nématodes, sans équivalent identifié chez les vertébrés, reste à déterminer (Kerboeuf *et al.* 2010).

*Haemonchus contortus*, parasite de la caillette des petits ruminants, a été utilisé comme modèle pour l'étude de la présence, de la localisation et des fonctions de protéines analogues à la Pgp 1 de l'homme (Kerboeuf & Riou, 2010). Les analyses sont difficiles en raison de la structure de ces parasites, organismes pluricellulaires protégés par des « enveloppes » spécifiques (coque des œufs, cuticule des autres stades). L'existence de nombreux stades de développement au cours de leur cycle impose une étude comparée de ces stades dont certains sont libres dans le milieu extérieur et d'autres sont parasites. De plus, les connaissances sur la composition biochimique des différentes membranes et enveloppes des nématodes sont, encore à l'heure actuelle, incomplètes.

Des analyses protéomiques ont montré la présence de Pgp dans les différents stades de développement d'*H. contortus* (Riou *et al.* 2005). Des études en microscopie (électronique à transmission ou confocale) ont permis d'observer la présence très originale de Pgp dans les enveloppes du parasite : la coque de l'œuf (figure 4), les cuticules aux stades larvaires libres ou parasites et aux stades adultes mâles et femelles. Comparées aux membranes cellulaires, ces enveloppes sont très épaisses et compor-



**Figure 4 :** Image de la coque d'un œuf d'*Haemonchus contortus*, trichostrongle parasite de la caillette de petits ruminants obtenue en microscopie confocale. En **A**, les glycoprotéines P sont marquées en brun rouge par un anticorps monoclonal (clone 4E3) et les radeaux lipidiques ou rafts sont marqués en vert par la toxine cholérique spécifique des sphingolipides (immunofluorescence indirecte). On note la colocalisation de ces deux structures (en jaune). En **B**, témoin isotypique montrant la fluorescence non spécifique.

tent, entre autres, une couche chitineuse considérée jusque là comme biologiquement peu active. Or, le marquage des Pgp, réalisé avec un anticorps monoclonal (clone UIC2), a été l'un des premiers indicateurs de leur rôle dans le transport des xénobiotiques dans ces structures de protection (Kerboeuf *et al.* 2003). Cet anticorps ne se fixe en effet que sur les Pgp ayant la conformation tridimensionnelle nécessaire pour l'activité de transport.

### Activité de transport des P-glycoprotéines chez les nématodes

#### Rôle propre des P-glycoprotéines

Le rôle fonctionnel des Pgp a été caractérisé par la mesure du rejet de substances connues comme substrats spécifiques de ces pompes, telle la rhodamine 123 (Kerboeuf *et al.* 1999). Nous avons ainsi comparé la valeur et la cinétique de l'efflux actif chez des nématodes sensibles ou résistants aux anthelminthiques. Ceci a permis de comprendre que les parasites résistants sont équipés, à un temps donné, d'un plus grand nombre de pompes actives que les parasites sensibles. Ils sont aussi capables d'en mobiliser d'autres très rapidement (Kerboeuf *et al.* 2003). Il en résulte une vitesse d'efflux accélérée qui réduit la durée de contact des nématodes résistants avec un toxique en concentration élevée, limitant ainsi son effet.

#### Rôle de l'environnement membranaire

Chez les vertébrés, l'activité des pompes et leur mobilisation sont sous l'influence de l'environnement membranaire, en particulier de sa composition lipidique. Parmi les lipides membranaires, le cholestérol joue un rôle modulateur important de leur activité, largement attribué à son action sur la fluidité de la membrane. Une concentration élevée en cholestérol en réduit la fluidité et, en conséquence, l'activité des

pompes. Les phospholipides, autres composants majeurs des membranes, modulent plus ou moins spécifiquement la solubilisation et la migration des xénobiotiques dans la membrane. Celle-ci n'est pas homogène du point de vue de la répartition de ces composants. Des structures particulières, les radeaux lipidiques (*rafts*) et les cavéoles comprenant une association de lipides spécifiques, en particulier de sphingomyéline, et de protéines ont été mises en évidence. La conformation tridimensionnelle des pompes, indispensable à leur activité, s'acquiert dans les radeaux lipidiques (Simons & Ikonen, 1997).

Des études semblables effectuées chez les nématodes parasites ont

montré une assez grande ressemblance avec les vertébrés, y compris la présence surprenante de structures comparables aux radeaux lipidiques dans la coque des œufs utilisés comme modèle d'étude (Riou *et al.* 2010). Quelques spécificités sont toutefois probables. En effet, les nématodes ne synthétisent pas ou peu le cholestérol qu'ils empruntent à leurs hôtes et qu'ils transforment. D'autres stérols sont présents chez les nématodes comme l'ergostérol ou le stigmastérol dont les propriétés particulières du point de vue de la dynamique des membranes ne sont pas connues.

La modification expérimentale de la concentration en cholestérol à l'aide d'un accepteur-donneur de cholestérol, la méthyl  $\beta$  cyclodextrine, a permis de démontrer le rôle de ce stérol, ou de son équivalent, dans l'activité des Pgp d'*H. contortus* (Riou *et al.* 2003). La concentration en cholestérol a une influence très significative sur la modulation de l'activité Pgp, et donc de la résistance des parasites aux anthelminthiques, induisant une augmentation cette dernière lors de la diminution de la concentration de cholestérol et réciproquement. Tous ces phénomènes ont été observés aussi bien chez les nématodes sensibles que chez les nématodes résistants mais ils sont exacerbés chez ces derniers.

## INHIBITION DE L'EFFLUX

### Les inhibiteurs de Pgp

Du fait de leur importance en pathologie humaine, la recherche d'inhibiteurs des transporteurs impliqués dans les mécanismes de chimiorésistance fait actuellement l'objet d'une intense recherche. La sélection des composés doit tenir compte à la fois de leur affinité pour le transporteur à bloquer mais aussi d'une spécificité maximale pour les tissus ou

organes à traiter. Compte-tenu des multiples rôles physiologiques ou de détoxication de ces transporteurs, les effets secondaires doivent être particulièrement étudiés de même que la possible altération de la pharmacologie des médicaments (Gottesman *et al.* 2002).

Certains inhibiteurs ne peuvent pas être administrés *in vivo* du fait de leur toxicité. C'est le cas du vérapamil qui possède, outre son action inhibitrice des Pgp, de nombreuses autres propriétés (Nygren & Larsson, 1990). Ils sont très utiles en expérimentation pour démontrer, le plus souvent en association avec des substrats spécifiques, le rôle des pompes dans le transport des xénobiotiques. Ainsi la présence de transporteurs ABC actifs, analogues à ceux des eucaryotes, a été montrée chez différents helminthes, trématodes (*Fasciola gigantica* schistosomes) ou nématodes parasites (Kerboeuf *et al.* 1996; Kerboeuf *et al.* 1999; Sato *et al.* 2002 ; Kerboeuf *et al.* 2003).

### Inhibition des pompes d'efflux des nématodes parasites

Grâce au vérapamil, l'application de la méthode d'inhibition de l'efflux à des nématodes vivants a mis en évidence l'existence de mécanisme de type MDR dans la résistance des trichostrongles aux anthelminthiques comme les dérivés du benzimidazole (Beugnet *et al.* 1997). Des résultats similaires ont été obtenus pour des lactones macrocycliques avec d'autres inhibiteurs, tels que la valspodar, la quercétine, le kétoconazole et le pluronique P85 (Bartley *et al.* 2009). L'utilisation, chez les nématodes, de substrats de Pgp classiquement employés pour les cellules eucaryotes a bien montré la ressemblance fonctionnelle des Pgp dans les deux modèles (Kerboeuf *et al.* 1999).

### Mise au point d'une nouvelle thérapeutique

Les enjeux de la sélection d'inhibiteurs de pompes d'efflux puissants et peu toxiques sont considérables tant en médecine humaine que vétérinaire. De très nombreux travaux sont menés dans ce domaine, particulièrement en cancérologie mais aussi maintenant en parasitologie. Des traitements associant le principe actif spécifique de la cible et un inhibiteur d'efflux sont en développement. Une des exigences majeures dans

la sélection de ces inhibiteurs est l'affinité la plus grande possible pour les transporteurs de l'agent pathogène, en ce qui nous concerne ici des nématodes parasites, car il ne faut pas priver l'hôte de ses moyens de détoxication. L'efficacité repose ainsi sur des différences fines de structures moléculaires des pompes des parasites, comparées à celles des pompes de l'hôte (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Cette recherche est compliquée par le rôle activateur de pompes que jouent certains médicaments comme les anthelminthiques (Kerboeuf & Guégnard, 2011). Un équilibre est donc à trouver dans le système capture-activation-inhibition constitué par l'ensemble pompes-médicaments. Notre équipe a déposé un brevet combinant antiparasitaires et inhibiteurs de pompes cellulaires d'efflux pour le traitement et/ou la prophylaxie de nématodoses dans le domaine vétérinaire ou pharmaceutique (n° 1054881, juin 2010).

Cette innovation présente trois avantages principaux :

- augmentation de la biodisponibilité des antiparasitaires chez les parasites et ainsi, réduction de la quantité de la substance active à administrer à l'hôte du fait d'une efficacité accrue vis-à-vis des parasites ;
- identification d'inhibiteurs plus spécifiques des pompes d'efflux Pgp des nématodes parasites ;
- nouvelles compositions antiparasitaires efficaces contre les parasites sensibles et/ou résistants, en abaissant le niveau de résistance de ces derniers.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les P-glycoprotéines jouent un rôle majeur dans la survie des nématodes dans des conditions défavorables, en particulier en présence de xénobiotiques toxiques. Elles interviennent pour une très large part dans l'efficacité des traitements anthelminthiques quelle que soit la famille chimique considérée. Leur activité de transport explique aussi les échecs dus au développement de résistance, en particulier de résistances multiples. Leur présence dans les enveloppes de protection des nématodes permet de comprendre leur rôle prédominant dans les échanges entre le parasite et son environnement. Une meilleure connaissance de la structure moléculaire particulière à ces parasites et de leurs fonctions constitue un apport crucial dans la recherche de nouveaux traitements.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., Wijnholds, J., Schinkel, A. H. 1999. The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* 59: 4237-4241.
- Allier, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., et al. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323: 1718-1722.
- Ambudkar, S. V. & Gottesman, M. M. 1998. ABC transporters: biochemical, cellular, and molecular aspects. *Methods Enzymol.* 292: 1-787.
- Bartley, D. J., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Menez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., Lespine, A. 2009. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 136: 1081-1088.
- Beugnet, F., Gauthey, M., Kerboeuf, D. 1997. Partial *in vitro* reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *Haemonchus contortus* with verapamil. *Vet Rec.* 141: 575-576.

## MÉMOIRE

- Bosch, I. & Croop, J. 1996. P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1288: F37-54.
- Bradshaw, D. M. & Arceci, R. J. 1998. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol.* 16: 3674-3690.
- Dean, M. & Allikmets, R. 2001. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembrane* 33: 475-479.
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 42: 1007-1017.
- Gottesman, M. M., Fojo, T., Bates, S. E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2: 48-58.
- Hoffmeyer, S., Burk, O., von Richter, O., Arnold, H. P., Brockmoller, J., John, A., Cascorbi, I., Gerloff, T., Roots, I., Eichelbaum, M., et al. 2000. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 97: 3473-3478.
- Hugnet, C. 2005. Pharmacologie vétérinaire : exemple de la mutation MDR1 chez le colley. *Bull Acad Vét France* 158 :67-70.
- Hugnet, C., Lespine, A., Alvinerie, M. 2007. Multiple oral dosing of ketoconazole increases dog exposure to ivermectin. *J Pharmaceut Sci.* 10: 311-318.
- Jackson, F. & Miller, J. 2006. Alternative approaches to control-quo vadit? *Vet Parasitol.* 139: 371-384.
- Johnston, M. J., MacDonald, J. A., McKay, D. M. 2009. Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. *Parasitology* 136: 125-147.
- Juliano, R. L. & Ling, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152-162.
- Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G., Ling, V. 1985. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316: 820-823.
- Kerboeuf, D., Aycardi, J., Soubieux, D. 1996. Flow-cytometry analysis of sheep-nematode egg populations. *Parasitol Res.* 82: 358-363.
- Kerboeuf, D., Chambrier, P., Le Vern, Y., Aycardi, J. 1999. Flow cytometry analysis of drug transport mechanisms in *Haemonchus contortus* susceptible or resistant to anthelmintics. *Parasitol Res.* 85: 118-123.
- Kerboeuf, D., Guégnard, F., Le Vern, Y. 2003. Detection of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance against anthelmintics in *Haemonchus contortus* using anti-human mdr1 monoclonal antibodies. *Parasitol Res.* 91: 79-85.
- Kerboeuf, D. & Guégnard, F. 2011. Anthelmintics are substrates and activators of nematode P-glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother.* 55: 2224-2232.
- Kerboeuf, D., Riou, M., Neveu, C., Issouf, M. 2010 a. Membrane drug transport in helminths. *Curr Med Chem Anti-Infect Agents* 9: 113-129.
- Kerboeuf, D., Riou, M. 2010 b. Nematodes as models for the study of the regulation of activity of P-glycoproteins in multidrug resistance (MDR). *Curr Med Chem Anti-Infect Agents* 5: 389-401.
- Klein, I., Sarkadi, B., Varadi, A. 1999. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1461: 237-262.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., Cole, S. P. 2001. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167: 3-23.
- Lespine, A., Alvinerie, M., Vercruyse, J., Prichard, R., Geldhof, P. 2008. ABC transporter modulation : a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends Parasitol.* 24 : 293-298.
- Mealey, K. L., Bentjen, S. A., Gay, J. M., Cantor, G. H. 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene. *Pharmacogenetics* 11: 727-733.
- Nygren, P. & Larsson, R. 1990. Verapamil and cyclosporin A sensitize human kidney tumor cells to vincristine in absence of membrane P-glycoprotein and without apparent changes in the cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration. *Biosci Rep.* 10: 231-237.
- Riordan, J. R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., Ling, V. 1985. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316: 817-819.
- Riou, M., Guégnard, F., Le Vern, Y., Kerboeuf, D. 2003. Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics. *J Antimicrob Chemother.* 52: 180-187.
- Riou, M., Koch, C., Delaleu, B., Berthon, P., Kerboeuf, D. 2005. Immunolocalisation of an ABC transporter, P-glycoprotein, in the eggshells and cuticles of free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res.* 96: 142-148.
- Riou, M., Guégnard, F., Sizaret, P. Y., Le Vern, Y., Kerboeuf, D. 2010. Drug resistance is affected by colocalization of P-glycoproteins in raft-like structures unexpected in eggshells of the nematode *Haemonchus contortus*. *Biochem Cell Biol.* 88: 459-467.
- Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M., Pastan, I. 1986. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 83: 4538-4542.
- Sato, H., Kusel, J. R., Thornhill, J. 2002. Functional visualization of the excretory system of adult *Schistosoma mansoni* by the fluorescent marker resorufin. *Parasitology* 125: 527-535.
- Saurin, W., Hofnung, M., Dassa, E. 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol.* 48: 22-41.
- Sayers, G. & Sweeney, T. 2005. Gastrointestinal nematode infection in sheep - a review of the alternatives to anthelmintics in parasite control. *Anim Health Res Rev.* 6: 159-171.
- Schinkel, A. H., Smit, J. J., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., van der Valk, M. A., Robanus-Maandag, E. C., te Riele, H. P., et al. 1994. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77: 491-502.
- Schinkel, A. H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C. A., van Deemter, L., Smit, J. J., van der Valk, M. A., Voordouw, A. C., Spits, H., van Tellingen, O., et al. 1997. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 94: 4028-4033.
- Simons, K. & Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
- von Samson-Himmelstjerna, G. & Blackhall, W. 2005. Will technology provide solutions for drug resistance in veterinary helminths? *Vet Parasitol.* 132: 223-239.