



UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS



ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences et Technologies
Équipe Multirésistance et Pouvoir pathogène des Nématodes

THÈSE présentée par :

Aymeric FAUVIN

soutenue le : 26 mai 2011

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline ou Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE AU LÉVAMISOLE CHEZ LES STRONGLES DIGESTIFS

THÈSE dirigée par :

M CABARET Jacques

Directeur de recherche, INRA (Tours)

Co-encadré par :

M NEVEU Cédric

Chargé de recherche, INRA (Tours)

RAPPORTEURS :

M BEECH Robin

Professeur, université McGill (Montréal)

M PRICHARD Roger

Professeur, université McGill (Montréal)

JURY :

M BEECH Robin

Professeur, université McGill (Montréal)

M CABARET Jacques

Directeur de recherche, INRA (Tours)

M PRICHARD Roger

Professeur, université McGill (Montréal)

M RASSCHAERT Denis

Professeur, université François Rabelais (Tours)

Remerciements

*Merci tout d'abord à **Cédric Neveu** à qui je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et ma sympathie pour m'avoir confié ce projet de thèse et avoir su m'orienter et me guider durant ces 3 années de dur labeur. Cette thèse a été lourde en rebondissements et suspens mais les résultats obtenus nous ont permis d'écrire à la fin une « jolie histoire ». Je te remercie également pour les lectures, relectures, corrections et recorections de ce manuscrit même si parfois il me revenait beaucoup plus léger qu'à l'origine (perdre 7 pages d'introduction en 5 minutes ça marque !!).*

*Je tiens également à remercier mon directeur de thèse **Jacques Cabaret**. Merci d'avoir toujours été là pour améliorer mes connaissances dans le domaine des nématodes parasites. Je vous remercie également pour sa gentillesse, sa bonne humeur, ainsi que sa disponibilité et pour les longues discussions scientifiques que l'on a eues.*

*Je souhaite remercier les Prs **Roger Prichard** et **Robin Beech** de l'université McGill à Montréal ainsi que le Pr **Denis Rasschaert** de l'université François Rabelais de Tours d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.*

*Je voudrais remercier **Thomas Boulin** et **Jean-Louis Bessereau** de l'école normale supérieure de Paris pour leur collaboration à ce travail pour la partie électrophysiologie et la reconstitution de récepteurs.*

*Je souhaite tout particulièrement remercier **Alexandra** pour ses commentaires, ses corrections et ses conseils durant la rédaction de cette thèse. Je te remercie pour ta patience, ta bonne humeur tes encouragements et pour les longues soirées que tu as dû sacrifier au profit de mon manuscrit. J'espère que tu seras aussi présente et disponible pour la préparation de mon oral.*

*Je tiens à remercier **Claude Charvet** pour les nombreux conseils qu'il m'a donné durant ces 3 ans, ainsi que pour ses nombreux protocoles « maison » qui je pense continueront à me servir par la suite. Sans oublier **Jacques** et **Christine** les deux techniciens exceptionnels qui sont à la base de ce travail. Merci de m'avoir fourni durant ces trois ans les isolats dont j'avais besoin et d'avoir répondu à mes questions avec autant de précision. Christine je te*

remercie également pour les longues conversations que l'ont a pu avoir dans le bureau ainsi que pour tes délicieuses petites tomates que tu faisais pousser rien que pour moi.

*Merci également à la deuxième partie de l'équipe : **Anne, Alisson, Fabien et Françoise.** Merci pour ces bons moments passés avec vous. Fabien, merci pour tous tes conseils lors des manip de western blot (galère ces résultats non reproductibles !!). Anne, Françoise et Alisson je vous remercie pour votre bonne humeur ainsi que pour le chocolat !!!!!*

*Un grand merci également à mon ancienne collègue **Alexia** qui même si elle m'a coûté cher en M&M's a été comme une sœur pour moi. Merci pour ses fous rires pendant nos journées passées à la paillasse, je te remercie également pour ta bonne humeur générale, de ton aide et de ton écoute dans les moments où j'en avais besoin. Je te souhaite à toi ainsi qu'à Sébastien de réussir dans ton nouveau domaine « l'épicerie pharmaceutique ;) ». Une petite pensée également pour ma « nièce » Lise et mon « neveu » Hugo qui je suis sûr te rendront encore plus fière dans l'avenir.*

*Merci également à toute l'équipe avec laquelle les « tables rondes » n'ont jamais été aussi intéressantes et animées : **Boby, Gaëlle, Gégé, Maryline, Nico, Sosthène, Fa & Ka.** Merci à **Momo** le premier stagiaire que j'ai pris sous mon aile, le futur roi de Mayotte, qui je l'espère me donnera une place de choix dans son futur ministère. Sans oublier mes copains de promo **Greg, Dam & petit Nico**, que je connais depuis le DEUG, merci pour ces soirées qui font partie intégrante de la vie étudiante.*

*Un grand merci pour mes potes de bredouille : **Vainvain, Picco & Tatayeah** avec qui j'espère encore passer de longues journées au bord de l'eau à attendre la touche inespérée.*

*Enfin à toute ma famille : **Elian, Estelle, Orlane, Charles** sans oublier ma petite puce **Méloë** qui grandit trop vite. À mes **parents** et **grands-parents** qui m'ont soutenu tout au long de ces études. J'espère que vous serez tous fiers de moi.*

Résumé

Actuellement, la lutte contre les strongles digestifs est essentiellement basée sur l'utilisation de traitements anthelminthiques. Cependant, leur utilisation massive a conduit à l'apparition d'isolats résistants. L'optimisation des stratégies de lutte nécessite une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la résistance. Dans ce contexte, nous avons cherché à identifier le récepteur au lévamisole, une des molécules anthelminthiques les plus utilisées en élevage. Nous avons mis en évidence l'existence d'une forme tronquée d'une des sous-unités du récepteur au lévamisole chez certains isolats résistants des 3 principales espèces de strongles digestifs : *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Le rôle de cette forme tronquée dans la fonctionnalité du récepteur a été testé en reconstituant le récepteur au lévamisole d'*H. contortus* en œufs de xénope. Ainsi, nous avons montré que la forme tronquée perturbe le fonctionnement normal du récepteur. Ce résultat constitue la première validation fonctionnelle d'un mécanisme moléculaire de résistance au lévamisole chez un nématode parasite.

Mots clés : Nématode, lévamisole, résistance, anthelminthiques, récepteur à l'acétylcholine.

Abstract

The control of gastrointestinal strongyles is largely based on the use of anthelmintic treatments. However, the widespread use of these treatments has led to the emergence of resistant isolates. The optimization of control strategies requires a better understanding of the molecular mechanisms involved in the acquisition of resistance. In the present study, we have identified the receptor of levamisole, an anthelmintic molecule widely used in livestock. We demonstrated the existence of a truncated form of subunits in some resistant isolates in the 3 main species of gastrointestinal nematodes: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. The role of this truncated form in the receptor functionality was tested by reconstituting the receptor of levamisole of *H. contortus* in *Xenopus* oocytes. Thus, we showed that the truncated form disrupts the normal function of the receptor. Here we provide the first functional evidence for a molecular mechanism involved in levamisole resistance in a parasitic nematode.

Keywords : nematode, levamisole, anthelmintic, resistance, acetylcholine receptor.

Table des matières

Ne rien saisir directement dans la table des matières : Positionner votre curseur dans la table des matières puis appuyer sur F9 ou clic droit – mettre à jour les champs. Ce texte est à supprimer après votre saisie.

Table des matières	1
Liste des tableaux	1
Liste des figures	2
Liste des annexes.....	3
INTRODUCTION.....	4
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I) Les nématodes	8
I.1) Organisation générale des nématodes.....	8
I.2) Systématique des nématodes	9
I.3) Les différents modes de vie des nématodes.....	10
I.3.1) Les nématodes libres	10
I.3.2) Les nématodes parasites de plantes	10
I.3.3) Les nématodes parasites d’animaux	11
II) Les strongles digestifs	12
II.1) Généralité sur les strongles gastro-intestinaux.....	12
II.2) Espèces de strongles d’intérêt agronomique	12
II.2.1) <i>Haemonchus contortus</i>	12
II.2.2) <i>Teladorsagia circumcincta</i>	13
II.2.3) <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	14
II.3) Cycle biologique	14
II.4) Moyens de luttés contre les strongles digestifs	15
II.4.1) Lutte contre la source de contamination	16
II.4.2) Augmentation de la résistance de l’hôte	17
III) Les anthelminthiques & mécanismes de résistance associés	20
III.1) Historique, définition & présentation générale.....	20
III.2) Les benzimidazoles.....	21
III.2.1) Présentation.....	21
III.2.2) Mode d’action des benzimidazoles	22
III.2.3) Mécanismes de résistance aux benzimidazoles	22

III.3) Les lactones macrocycliques.....	23
III.3.1) Présentation.....	23
III.3.2) Mode d'action des lactones macrocycliques.....	24
III.3.3) Mécanismes de résistance aux lactones macrocycliques	26
III.4) Les dérivés d'aminocétonitrile	27
III.4.1) Présentation.....	27
III.4.2) Mode d'action des dérivés d'aminocétonitrile	27
III.4.3) Mécanismes de résistance des dérivés d'aminocétonitrile	27
III.5) Les agonistes cholinergiques	28
III.5.1) Présentation.....	28
III.5.2) Mode d'action des agonistes cholinergiques	29
III.5.3) Mécanismes de résistance aux agonistes cholinergiques	30
IV) Les récepteurs à l'acétylcholine.....	32
IV.1) Historique	32
IV.2) Présentation générale	33
IV.2.1) Les récepteurs canaux activés par des ligands.....	33
IV.2.2) Structure générale des récepteurs à l'acétylcholine	33
IV.2.3) Fonctionnement des récepteurs à l'acétylcholine	34
IV.2.4) Maladies, addictions et cibles pharmaceutiques des récepteurs à l'acétylcholine	35
IV.2.5) Récepteur à l'acétylcholine et épissage alternatif.....	36
IV.3) Les récepteurs à l'acétylcholine du nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	37
IV.3.1) Les récepteurs à l'acétylcholine identifiés.....	37
IV.3.2) Le récepteur au lévamisole	39
V) Objectifs de la thèse	41
RÉSULTATS	42
ARTICLE 1	43
ARTICLES 2 & 3.....	59
ARTICLE 4.....	73
DISCUSSION / PERSPECTIVES	124
1) La résistance au lévamisole	125
2) La fonction de la sous-unité Hco-ACR-8	127
3) La reconstitution de récepteur en œufs de xénope	128
BIBLIOGRAPHIE	131

ANNEXES	149
Résumé	158
Abstract	158

Liste des tableaux

Tableau I : Estimation de la morbidité et de la mortalité dues aux nématodes humains les plus courants dans le monde.	11A
Tableau II : Principaux strongles digestifs ovins en France.....	12A
Tableau III : Caractéristiques des 3 principaux genres de parasites du tractus digestif chez les ovins et caprins.....	12A
Tableau IV : Principaux anthelminthiques utilisés en médecine vétérinaire en France.....	20A
Tableau V : Récepteurs canaux à boucle cystéine.	33A
Tableau VI : Différentes classes de sous-unités de récepteurs à l'acétylcholine des organismes modèles.....	34A
Tableau VII : Détail des sous-unités identifiées chez <i>C. elegans</i>	37A
Tableau VIII : Détail des gènes identifiés chez les mutants résistants au lévamisole de <i>C. elegans</i>	39A
Tableau IX : Description des différents TDFs identifiés au cours de l'approche de cDNA-AFLP.	70A

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale d'un nématode (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	8A
Figure 2 : Phylogénie du phylum Nematoda.....	10A
Figure 3 : Morphologie d' <i>Haemonchus contortus</i>	13A
Figure 4 : Morphologie de <i>Teladorsagia circumcincta</i>	13A
Figure 5 : Morphologie de <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	14A
Figure 6 : Cycle biologique des strongles digestifs chez les ovins.	14A
Figure 7 : Structure chimique des benzimidazoles.....	21A
Figure 8 : Mode d'action d'une molécule de benzimidazole	22A
Figure 9 : Structure chimique des lactones macrocycliques.	24A
Figure 10 : Schéma d'un récepteur au glutamate	25A
Figure 11 : Structure chimique du monepantel	27A
Figure 12 : Structure chimique des agonistes cholinergiques.	28A
Figure 13 : Structure générale d'une sous unité d'un récepteur à l'acétylcholine.	33A
Figure 14 : Structure générale d'un récepteur à l'acétylcholine	34A
Figure 15 : Fonctionnement d'une synapse cholinergique.....	35A
Figure 16 : Représentation schématique des différentes protéines interagissant avec le récepteur au lévamisole.	40A
Figure 17 : Combinaisons possibles d'assemblage des sous-unités du L-AChR1.....	122A
Figure 18 : Combinaisons possibles d'assemblage des sous-unités du L-AChR2.....	123A

Liste des annexes

Annexe 1 : Résumé de la communication orale présentée à la WAAVP 2009 (Calgary)	150
Annexe 2 : Communication affichée présentée à EMOP X 2008(Paris)	151
Annexe 3 : Article publié dans le bulletin de l'académie vétérinaire de France.....	152

INTRODUCTION

La France comporte aujourd'hui environ 60 000 élevages ovins et 5 300 caprins répartis principalement dans quatre régions : l'Auvergne, le Midi-Pyrénées, le Poitou-Charentes et la région Provence-Alpes-Côte-D'azur. En 2008, la France a produit 11% de la viande ovine européenne derrière l'Espagne (21%) et le Royaume-Uni (33%) avec un cheptel de 7,8 millions d'animaux. La filière caprine quant à elle est composée de 1,3 millions de têtes pour une production annuelle de 574 millions de litres de lait et de 20 000 tonnes de fromages. La France est également le second consommateur européen de viande ovine avec une consommation annuelle estimée à 3,7 Kg de viande par habitant. Les dépenses liées aux problèmes de santé au sein d'un élevage représentent de 7 à 12 % des coûts de production (jusqu'à 30 % pour un élevage de type biologique). Parmi les agents pathogènes portant atteinte à la santé du bétail, les nématodes parasites et plus particulièrement les strongles parasites du tractus digestif sont présents dans la quasi-totalité des fermes ovines et caprines en France. Trois espèces sont rencontrées majoritairement chez les petits ruminants de rente : *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Ces espèces engendrent des déficits économiques importants liés aux coûts des traitements ainsi qu'aux pertes de production (viande, laine, lait) et à la mort des animaux les plus faibles.

Même si de nombreuses méthodes de lutte alternative sont en cours de développement actuellement, le principal moyen d'éliminer ces nématodes parasites dans les élevages est basé sur l'utilisation de molécules chimiques aux propriétés anthelminthiques. Il existe trois grandes familles d'anthelminthiques disponibles sur le marché : les benzimidazoles, les lactones macrocycliques et les imidazothiazoles. L'utilisation fréquente de ces molécules a inévitablement entraîné l'apparition de résistances au sein des populations de strongles digestifs rendant les traitements inefficaces. L'étude des mécanismes à l'origine de ces résistances représente donc un enjeu important dans l'optimisation de la lutte contre ces nématodes. Si les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux benzimidazoles ont été clairement identifiés, ceux impliqués dans la résistance aux imidazothiazoles et aux lactones macrocycliques restent encore largement méconnus.

Dans la famille des imidazothiazoles, le lévamisole est la molécule la plus utilisée en élevage aujourd'hui. Ce composé a pour cible un sous-type de récepteur à l'acétylcholine. Ces récepteurs sont présents dans de nombreux organismes pluricellulaires et leur structure ainsi que leur fonction ont été très conservées au cours de l'évolution. Il en existe de nombreux sous-types qui possèdent des propriétés pharmacologiques variées. La divergence génétique entre les nématodes et les mammifères a permis l'utilisation de composés anthelminthiques

comme le lévamisole possédant une affinité hautement supérieure pour les récepteurs de nématodes que pour celui de leur hôte. Chez les nématodes, le lévamisole est un agoniste d'un sous-type de récepteur à l'acétylcholine : le récepteur au lévamisole (L-AChR). L'activation prolongée des L-AChRs de nématodes provoque la paralysie des parasites qui se retrouvent ainsi éliminés de l'organisme de l'hôte au cours du transit digestif.

La compréhension du ou des mécanismes à l'origine de la résistance au lévamisole nécessite une bonne connaissance de sa cible et de son mode d'action. Mon travail de thèse s'est orienté vers la recherche et la caractérisation de gènes potentiellement impliqués dans la résistance au lévamisole par deux approches complémentaires réalisées chez trois espèces de strongles digestifs *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Les trois principaux axes de recherche abordés dans ce travail étaient :

- 1- La recherche des gènes potentiellement impliqués dans la résistance au lévamisole chez les strongles digestifs *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*.
- 2- L'identification de la composition en sous-unités du récepteur cible du lévamisole chez les strongles digestifs.
- 3- La validation fonctionnelle de l'implication du polymorphisme observé sur des sous-unités du récepteur dans la résistance au lévamisole.

Dans la partie bibliographique je reviendrai sur les généralités concernant les nématodes, puis plus précisément sur les strongles digestifs. Je poursuivrai par une description des principales familles d'anthelminthiques utilisées aujourd'hui ainsi que sur les travaux actuels concernant leurs mécanismes de résistance associés. Puis je terminerai sur l'état des connaissances sur les récepteurs à l'acétylcholine (cible du lévamisole).

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

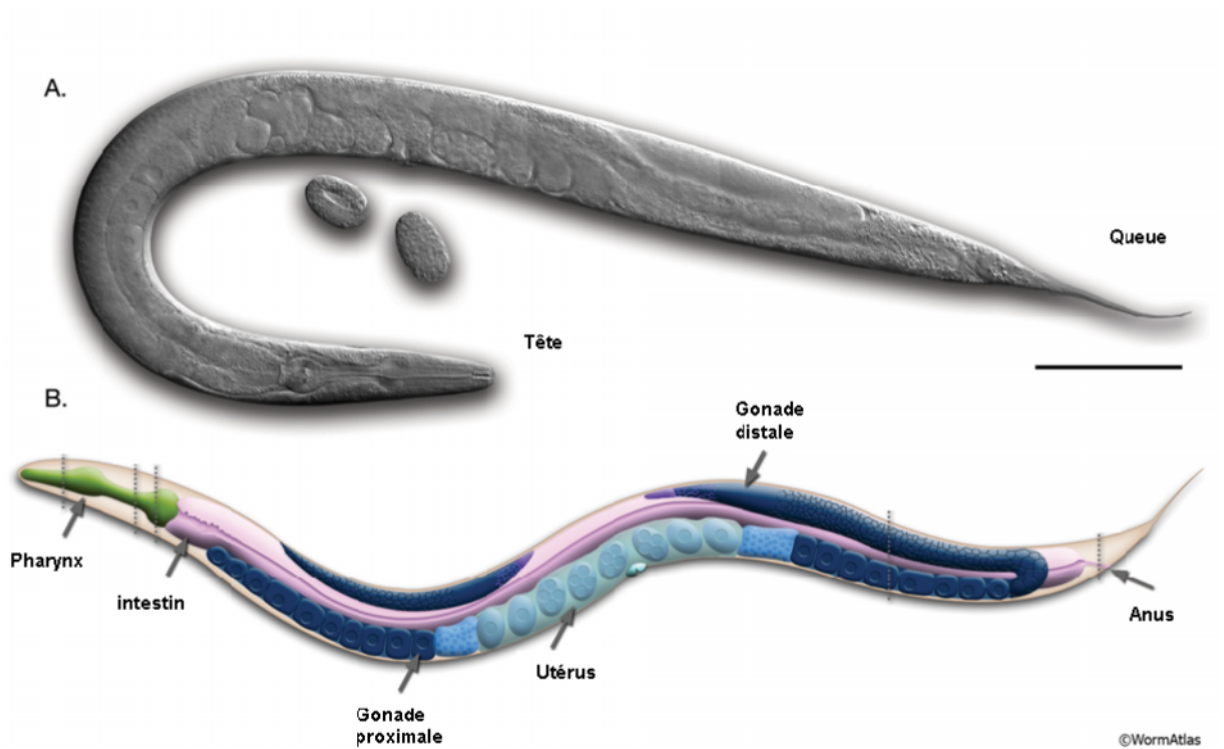


Figure 1 : Structure générale d'un nématode (*Caenorhabditis elegans*). Photographie d'un adulte hermaphrodite avec ses œufs (A). Schéma d'un adulte hermaphrodite (B) (<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>).

I) Les nématodes

Le mot nématode vient du grec *nêma* qui signifie fil et de *eidos* qui signifie apparence. Cette simple description suffit à définir un phylum entier (Nematoda) comprenant plus de 20 000 espèces décrites et dont les estimations actuelles révèlent qu'il pourrait en contenir plusieurs millions (Blaxter *et al.*, 1998, Hugot *et al.*, 2001).

Les nématodes se développent dans une grande diversité d'habitats et possèdent un potentiel adaptatif important vis-à-vis de leur milieu de vie. Certaines espèces évoluent librement dans le milieu extérieur, d'autres ont besoin d'infester un hôte (animal ou végétal) au cours de leur développement pour survivre.

I.1) Organisation générale des nématodes

Malgré des modes de vie et des tailles différentes, la morphologie générale des nématodes est très conservée entre les différentes espèces connues. La structure classique d'un nématode se traduit par une forme cylindrique avec une extrémité plus effilée au niveau de la queue et plus large au niveau de la tête (Figure 1). Ces animaux sont des vers ronds non segmentés à symétrie bilatérale. Ils possèdent une cuticule de collagène à la fois solide et flexible leur permettant des mouvements tout en les protégeant du milieu extérieur. La forme générale du nématode est maintenue par un hydrosquelette et un système d'excrétion / sécrétion qui permettent une osmorégulation essentielle pour le maintien de l'intégrité structurale du ver. Les nématodes n'ont pas de système circulatoire ou respiratoire, la respiration s'effectue grâce à des pores présents au niveau de la cuticule.

L'appareil digestif des nématodes est composé de trois parties : le stomodeum, l'intestin et le proctodeum. Le stomodeum correspond à la bouche, la cavité buccale et le pharynx. Cette partie du nématode joue un rôle dans la nutrition et est très variable selon les espèces. Par exemple chez les nématodes phytoparasites, un organe supplémentaire, le stylet, permet de prélever le contenu des cellules de l'hôte. L'intestin comprend de nombreuses cellules qui servent à capter les nutriments et le proctodeum comporte un rectum et se termine par un anus.

Chez les nématodes il y a plusieurs types de reproduction :

- La reproduction sexuée dans laquelle les sexes sont séparés avec en général un dimorphisme sexuel apparent comme par exemple chez le strongle digestif *Haemonchus contortus*.
- L'hermaphrodisme dans laquelle la reproduction s'effectue soit entre deux individus (1 mâle et 1 hermaphrodite) soit au sein d'un même individu hermaphrodite. Ce type de reproduction est rencontré, par exemple, chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*.
- Enfin d'autres espèces se reproduisent par parthénogénèse c'est-à-dire qu'il n'y a pas de fécondation ni d'échange de gènes, c'est le cas du notamment du nématode phytoparasite *Meloidogyne incognita*.

Le système nerveux des nématodes est assez rudimentaire, il est formé d'un collier œsophagien et de nerfs qui suivent les lignes dorsales, ventrales et latérales jusqu'aux extrémités du corps. Le système nerveux des nématodes est composé de 2 parties : un large système nerveux somatique et un petit système nerveux œsophagien. Il est composé de nombreux neurones interconnectés entre eux. Il sert notamment au mécanisme de pompage au niveau du pharynx qui permet aux nématodes de se nourrir ou pour la locomotion.

I.2) Systématique des nématodes

Les nématodes sont des métazoaires triploblastiques appartenant à l'embranchement des némathelminthes. Classiquement, ils sont rangés dans le groupe des pseudo-cœlomates, bien qu'une théorie alternative récente tend à classer les nématodes dans le groupe des Ecdysozoa : regroupant ainsi les nématodes et les arthropodes (Adoutte *et al.*, 1999, Dopazo & Dopazo, 2005).

A l'heure actuelle la classification des nématodes est basée sur la morphologie et le mode de vie des différentes espèces (Dorris *et al.*, 1999). Le phylum est divisé en deux classes : les Adenophorea (prédominance marine) qui comportent principalement des espèces libres de nématodes marins, d'eau douce ou de sols. La seconde classe, les Secernenta (prédominance terrestre) comporte de nombreuses espèces de nématodes parasites d'animaux ou de plantes ainsi que des nématodes libres (Blaxter *et al.*, 1998).

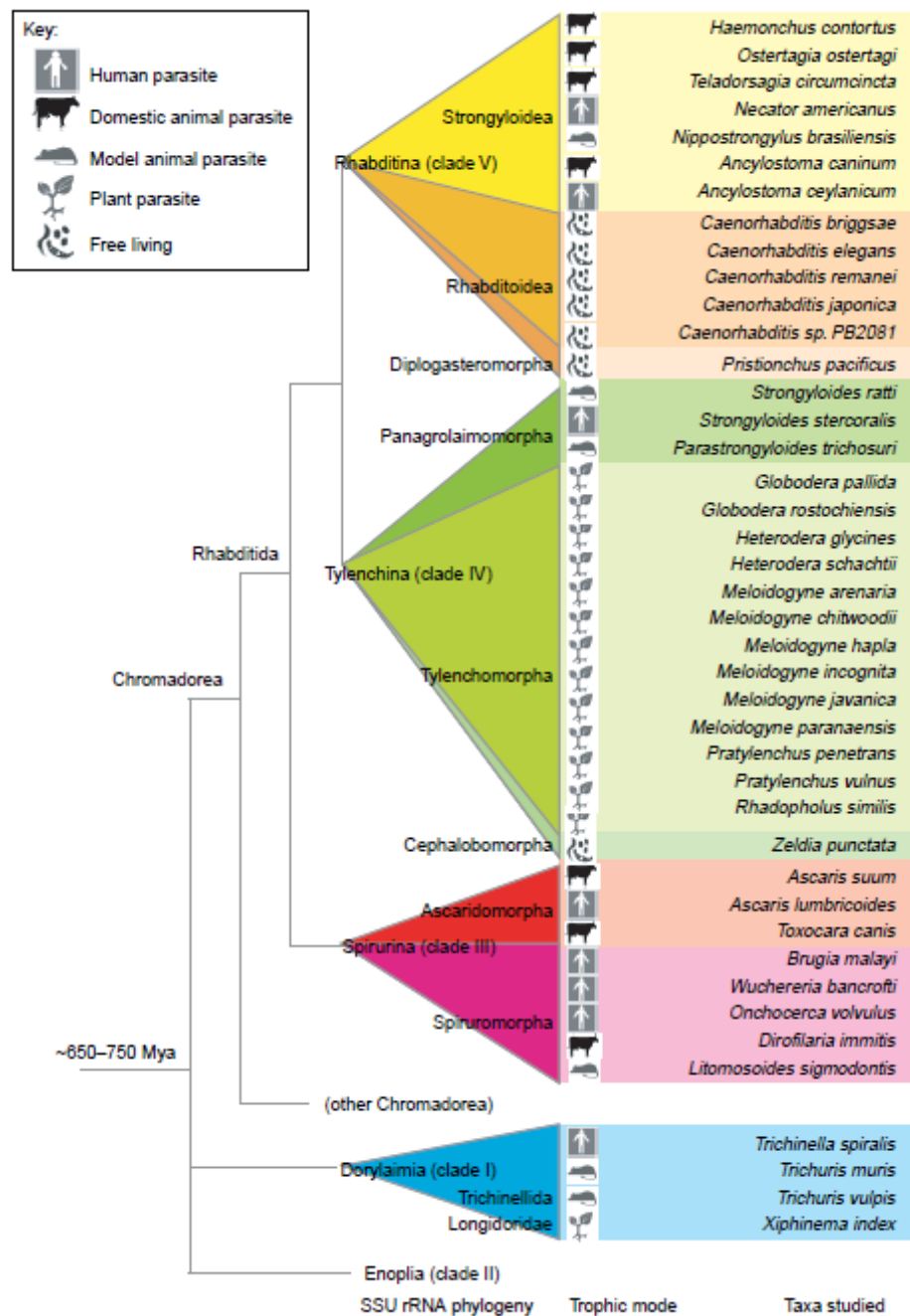


Figure 2 : Phylogénie du phylum Nematoda. Cette phylogénie est basée sur la séquence complète de la petite sous unité 18S de l'ARN ribosomal (Mitreva *et al.*, 2005).

Cette classification historique est néanmoins remise en cause aujourd'hui par les techniques de biologie moléculaire. Une classification des nématodes a été réalisée à l'aide de la séquence de la petite sous-unité (SSU) 18S du ribosome de chaque espèce (Blaxter *et al.*, 1998). Les données obtenues à partir de cette séquence ont permis de comparer au niveau moléculaire des nématodes parasites de plantes, d'animaux ou libres (Figure 2). De cette étude, cinq groupes (clades) se sont différenciés, composés de nématodes ayant des caractères morphologiques et des modes de vie différents (libre ou parasite) (Blaxter *et al.*, 1998). Le clade V (Rhabditina) est composé de deux familles : les Rhabditoidea qui regroupent des genres de nématodes libres tel que *Caenorhabditis* spp., et les Strongyloidea qui regroupent des parasites de vertébrés tels que *Necator americanus* pour l'Homme ou encore *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*, nématodes parasitant les animaux de rente faisant l'objet de cette thèse.

I.3) Les différents modes de vie des nématodes

I.3.1) Les nématodes libres

Les espèces de nématodes libres représentent environ la moitié des espèces de nématodes décrites à ce jour (Blaxter, 1998). Ces espèces sont généralement de petite taille (soit environ 1 mm à l'état adulte) et se retrouvent dans les milieux aquatiques divers tels que les sédiments des océans ou encore le sol, à raison de plusieurs millions d'individus par mètre carré (Blaxter, 1998). Ce sont des espèces majoritairement bactériophages qui jouent un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes en contribuant à la décomposition des végétaux et la gestion de la flore microbienne (Mesel *et al.*, 2004, Steel *et al.*, 2010). Des espèces libres, comme *C. elegans*, se nourrissent de bactéries et sont facilement cultivables en laboratoire ce qui en fait des modèles de prédilection pour de nombreuses études cellulaires et génétiques.

I.3.2) Les nématodes parasites de plantes

Les nématodes parasites de plantes ou phytoparasites possèdent une large gamme d'hôtes : plantes céréalières, maraîchères, fleurs ou encore les arbres fruitiers. Ils provoquent des pertes agronomiques estimées à environ 100 milliards d'euros dans le monde (Sasser & Freckman, 1987, Haq *et al.*, 2004). En raison de leur petite taille (de 0,5 mm à 1,5 mm), ils sont souvent passés inaperçus dans le rôle qu'ils jouaient sur certaines pathologies de plantes. Certains de ces nématodes s'attaquent aux parties aériennes de la plante (*Ditylenchus* spp.,

Tableau I : Estimation de la morbidité et de la mortalité dues aux nématodes humains les plus courants dans le monde (Crompton, 1999)

Nématode	Prévalence de l'infestation (en millions)	Morbidité (nombre de cas en millions)	Mortalité (nombre de décès en milliers)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1450	350	60
<i>Ancylostoma duodenale</i> <i>Necator americanus</i>	1300	150	65
<i>Trichuris trichiura</i>	1050	220	10

Aphelenchoides spp.), d'autres espèces plus majoritaires s'attaquent à la partie racinaire (*Pratylenchus* spp., *Globodera* spp., *Meloidogyne* spp.). En raison de leur résistance aux conditions environnementales et de leur mode de vie souterrain, il est très difficile de lutter contre ces nématodes et de maîtriser les dégâts qu'ils occasionnent. L'utilisation de produits chimiques de synthèse comme moyen de lutte est aujourd'hui interdit en raison de leur toxicité pour les sols et pour les utilisateurs. L'utilisation de plantes résistantes est à ce jour l'alternative la plus utilisée (Lilley *et al.*, 2005).

I.3.3) Les nématodes parasites d'animaux

Les nématodes parasites d'animaux possèdent également un large spectre d'hôtes qui s'étend des invertébrés pour 1/3 d'entre eux (arthropodes, mollusques) aux vertébrés pour les 2/3 restants (oiseaux, mammifères) (Hugot *et al.*, 2001). Leur taille varie en fonction de l'hôte infesté et s'étend de moins d'1 mm jusqu'à 8 mètres pour *Placentonema gigantisma* : nématode parasite de la baleine. L'infestation par des nématodes parasites est souvent associée à des symptômes tels que l'anémie, la perte d'appétit, la perte de poids, diarrhée, etc. Chez les animaux de rente ces nématodes induisent donc d'importantes pertes économiques pour les élevages.

L'Homme n'est pas épargné par ce type d'agent pathogène, en effet on estime que dans le monde plus de 2 milliards de personnes sont infestées dont 300 millions avec une morbidité importante et il y a environ 155 000 décès par an dus aux helminthiases (Crompton, 1999) (Tableau I). Près d'un milliard de personnes à travers le monde est infesté par *Ascaris lumbricoides* et 600 millions de Sud Américains par les espèces hématophages telles que *Ancylostoma duodenale* et *Necator americanus*. La transmission de nématodes parasites chez l'Homme peut résulter, en fonction de l'espèce, d'une contamination par de l'eau souillée, par les piqûres d'insectes qui servent de vecteurs (comme pour la filaire *Brugia malayi*) ou encore par l'ingestion de nourriture contaminée (*Trichinella spiralis*) (Blaxter, 1998).

Tableau II : Principaux strongles digestifs ovins en France d'après (Cabaret, 2004)

Espèces	Organes cibles	Distribution dans les fermes françaises	Pathogénicité
<i>Chabertia ovina</i>	Gros intestin	Fréquent	Moyenne à forte
<i>Cooperia</i> spp.	Intestin grêle	Irrégulière	Faible
<i>Haemonchus contortus</i>	Caillette	Irrégulière	Moyenne à forte
<i>Marshallagia marshalli</i>	Caillette	Rare	Moyenne à forte
<i>Nematodirus</i> spp.	Intestin grêle	Fréquent (jeune)	Moyenne à forte
<i>Oesophagostomum venulosum</i>	Gros intestin	Fréquent	Faible
<i>Ostertagia Ostertagi</i>	Caillette	Si présence de bovins	Faible à moyenne
<i>Strongyloides papillosus</i>	Intestin grêle	Assez fréquent	Faible à moyenne
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Caillette	Toutes	Faible à moyenne
<i>Trichostrongylus axei</i>	Caillette	Irrégulière	Moyenne
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Intestin grêle	Toutes	Faible à moyenne
<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	Caillette /intestin grêle	Irrégulière	Moyenne
<i>Trichuris</i> spp.	Gros intestin	Presque toutes	Faible

Tableau III : Caractéristiques des 3 principaux genres de parasites du tractus digestif chez les ovins et caprins.

Genres	Description	Organes infestés	Cycle de vie	Symptômes
<i>Haemonchus</i>	: 10-20 mm : 18-30 mm	Caillette	Libre : 4-6 jours Prépatente : 3 semaines	Anémie Œdèmes Affaiblissement Perte de poids
<i>Teladorsagia</i>	: 6-9 mm : 8-12 mm	Caillette	Libre : 4-6 jours Prépatente : 3 semaines	Œdèmes Affaiblissement Perte de poids Diarrhée
<i>Trichostrongylus</i>	: 4-5,5 mm : 5-7 mm	Intestin grêle Caillette	Libre : 3-4 jours Prépatente : 2-3 semaines	Œdèmes Affaiblissement Perte de poids Diarrhée

II) Les strongles digestifs

Le phylum Nematoda regroupe donc un nombre impressionnant d'espèces de nématodes avec un panel de morphologies et de modes de vie très varié. Dans les élevages de ruminants, les strongles digestifs font partie des pathogènes les plus fréquemment rencontrés car présents dans la quasi-totalité des élevages (Tableau II).

II.1) Généralité sur les strongles gastro-intestinaux

Les strongles digestifs sont des parasites d'animaux vertébrés qui infestent et se développent dans l'appareil digestif de leurs hôtes. Les espèces d'intérêt agronomique sont cosmopolites avec cependant une prédominance de certaines d'entre elles en fonction du climat. En zones tempérées, les deux strongles les plus fréquemment rencontrés dans les élevages de petits ruminants sont *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. En zone tropicale *Haemonchus contortus* est une espèce très présente et très pathogène (O'Connor *et al.*, 2006).

II.2) Espèces de strongles d'intérêt agronomique

Le phénomène d'infestation des animaux de rente par des nématodes parasites et notamment des strongles digestifs est un problème à l'échelle mondiale. Il s'agit dans la plupart des cas d'infestations multi-spécifiques. Dans le cadre de ma thèse le modèle d'étude utilisé a été *H. contortus*, nématode parasite d'animaux le plus étudié bien que sa présence dans nos zones tempérées soit sporadique. Au cours de ce travail je me suis également intéressé à deux espèces de strongles que l'on retrouve dans presque toutes les fermes d'élevage français et dans de nombreux autres pays : *T. circumcincta* et *T. colubriformis*. Les caractéristiques principales de ces trois genres sont présentées dans le tableau III.

II.2.1) *Haemonchus contortus*

H. contortus est un parasite principalement retrouvé dans les zones climatiques tropicales (l'Afrique, l'Amérique centrale et le sud-est asiatique) et subtropicale (l'Australie et l'Amérique du sud). Cependant cette espèce est également présente dans les pays européens (Waller *et al.*, 2004a, Eysker *et al.*, 2005). L'embryonnement des œufs se fait à une température optimale comprise entre 20 et 30°C ce qui fait que dans les pays européens (à

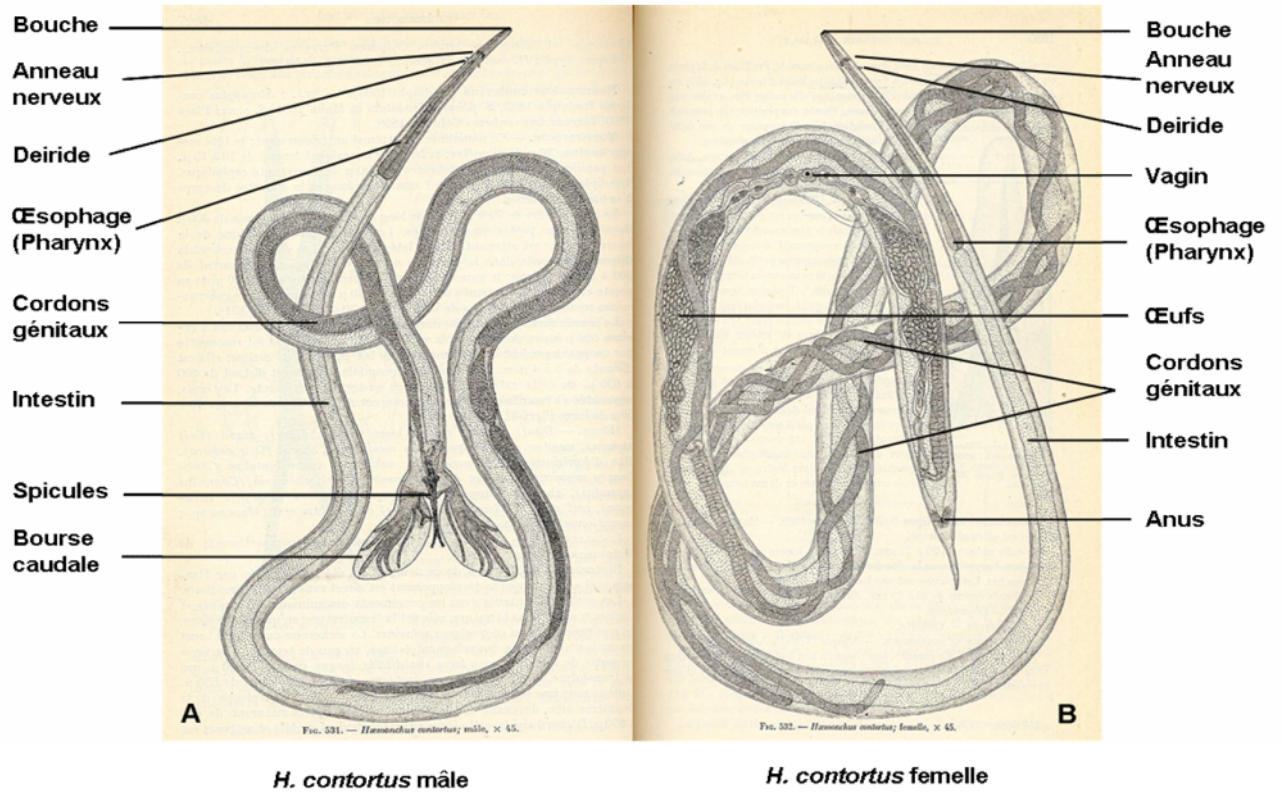


Figure 3 : Morphologie d'*Haemonchus contortus* (représentation schématique d'un mâle en A et d'une femelle en B) d'après (Neveu-Lemaire, 1936).

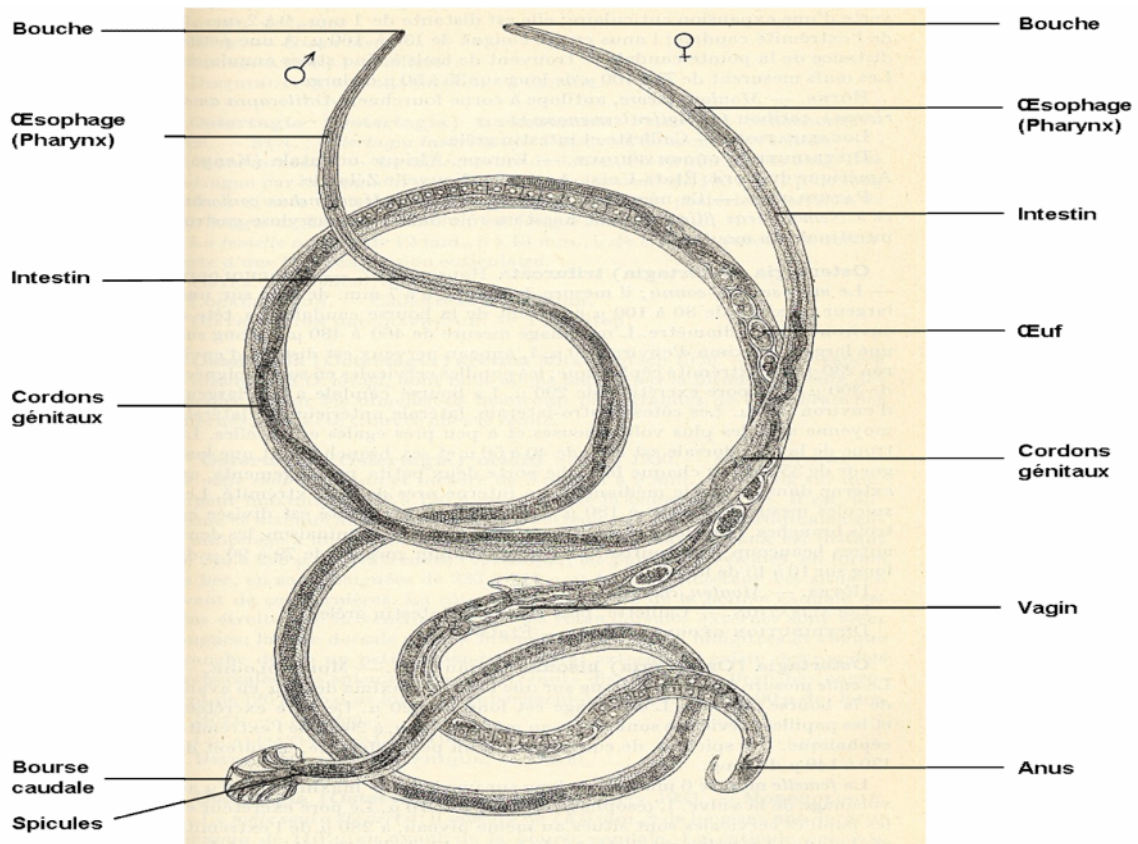


Figure 4 : Morphologie de *Teladorsagia circumcincta* d'après (Neveu-Lemaire, 1936)

température hivernale froide) la mortalité est forte à ce stade de développement. Cette espèce possède une forte capacité à entrer en hypobiose c'est-à-dire à arrêter son développement au stade L₄ durant la période hivernale ce qui lui permet de survivre en région tempérée (Barger & Le Jambre, 1988). De plus les femelles sont très prolifiques avec une ponte moyenne de 5000 à 10000 œufs par jour et par femelle (Coyne *et al.*, 1991) pour pallier au problème de forte mortalité à ce stade œuf. Les sexes sont séparés avec un dimorphisme sexuel : les mâles sont plus petits que les femelles (Figure 3).

H. contortus est un parasite qui a pour organe cible la caillette des petits ruminants (ovins et caprins) et qui mesure entre un et trois centimètres à l'âge adulte. C'est une espèce très pathogène du fait de son caractère hématophage. Les parasites absorbent le sang au niveau des vaisseaux capillaires de la muqueuse digestive, ce qui représente un volume d'environ 50 µl de sang par nématode et par jour (Clark *et al.*, 1962). Il provoque chez l'hôte infesté des troubles digestifs qui peuvent donner lieu à de la diarrhée et une perte de poids. Certains symptômes sont plus insidieux comme la perte au niveau de la production de lait, l'altération des capacités de reproduction (Poppi *et al.*, 1990), ou encore l'anémie qui peut entraîner la mortalité de 45 % des jeunes agneaux infestés (Vlassoff & McKenna, 1994).

En raison de son pouvoir pathogène, *H. contortus* est l'espèce la plus étudiée. Elle est fréquemment retrouvée dans de nombreux élevages à travers le monde. Cette espèce sert de modèle d'étude pour les strongles digestifs.

II.2.2) *Teladorsagia circumcincta*

T. circumcincta est un parasite surtout retrouvé dans les zones tempérées où il est responsable d'importantes pertes économiques dans les élevages (Fox, 1997). En France la quasi-totalité des élevages ovins et caprins est infestée par cette espèce (Chartier & Reche, 1992, Cabaret, 2004). Contrairement à *H. contortus* qui est très prolifique, chaque femelle pond une centaine d'œufs par jour. La durée complète de son cycle (hors phénomène d'hypobiose) est de 17 jours. Les adultes colonisent la lumière de la caillette, collés à la muqueuse près des sécrétions de mucus où le pH est proche de 7 (Scott *et al.*, 2000). Les sexes sont séparés et les mâles sont plus petits que les femelles (Figure 4).

C'est un nématode histophage, c'est-à-dire qu'il se nourrit des tissus de l'hôte. Les symptômes associés sont la perte d'appétit, ainsi qu'une diarrhée profuse qui entraîne une déshydratation de l'animal et la perte de poids.

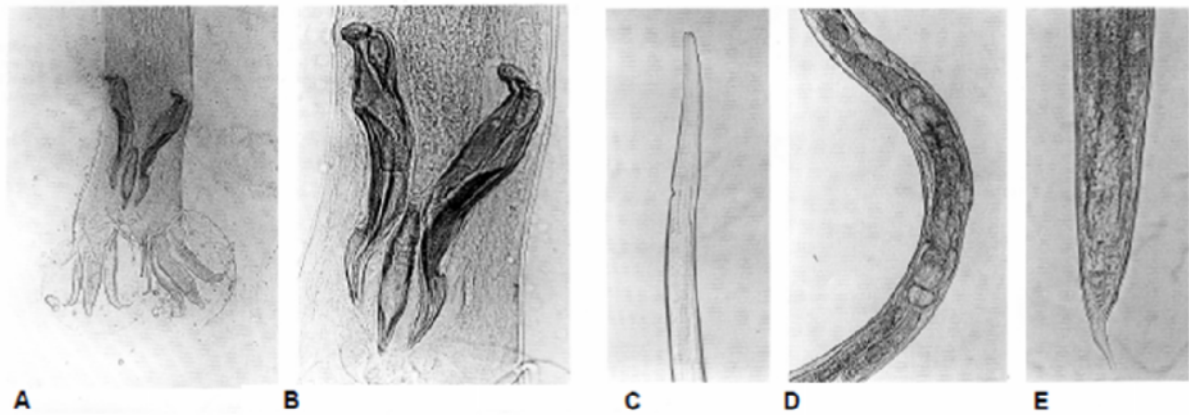


Figure 5 : Morphologie de *Trichostrongylus colubriformis* A : Bourse caudale du mâle adulte, B : spicules, C : cavité buccale, D : Vulve de la femelle, E : Extrémité caudale effilée de la femelle d'après (Barth & Visser, 1991)

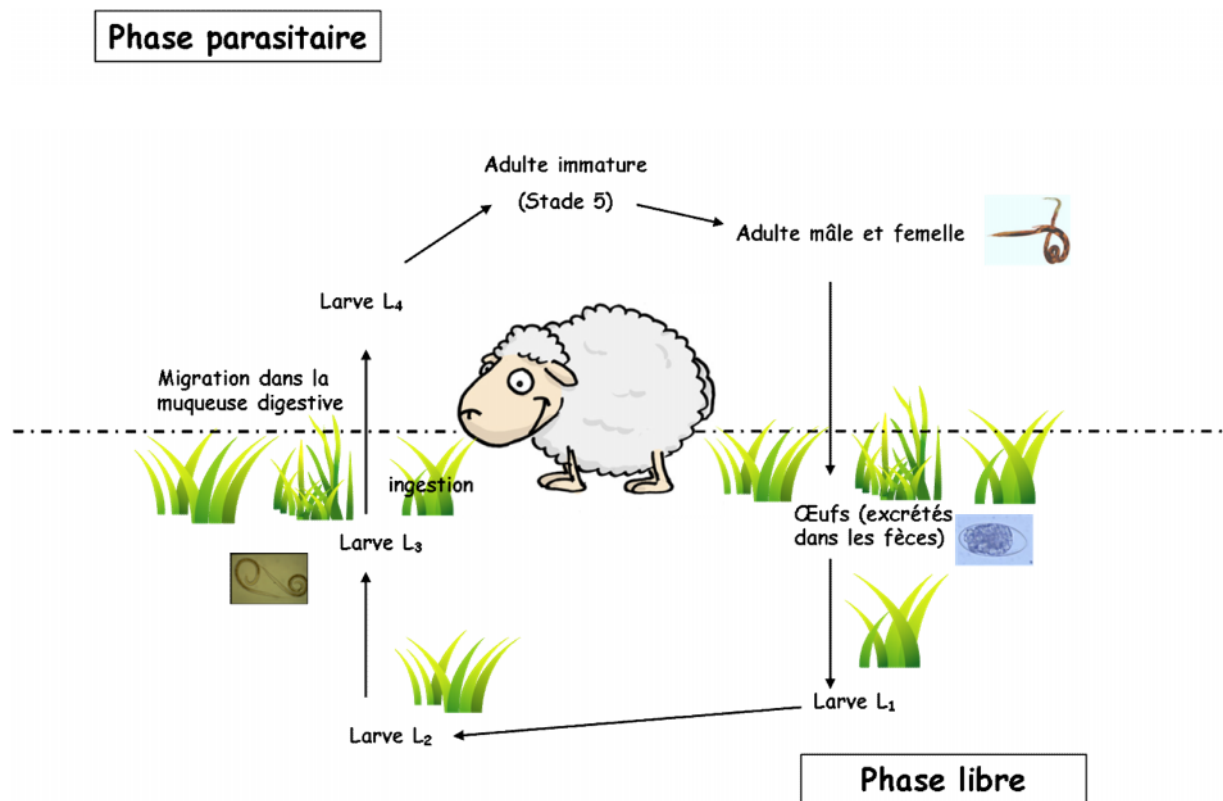


Figure 6 : Cycle biologique des strongles digestifs chez les ovins.

II.2.3) *Trichostrongylus colubriformis*

T. colubriformis est un nématode qui se retrouve dans la portion proximale de l'intestin grêle des petits ruminants. Toutefois il existe des cas d'infestation humaine (Sato *et al.*, 2011, Wall *et al.*, 2011). Chez les ruminants cette espèce est retrouvée partout dans le monde, comme les deux autres strongles cités précédemment. Il possède un cycle monoxène qui dure environ 20 jours. Cette espèce peut survivre à des températures plus basses que *H. contortus* ce qui fait qu'elle est moins encline à entrer en hypobiose. Les adultes sont difficilement visibles à l'œil nu du fait de leur faible diamètre et de leur longueur inférieure à 7 mm. Cette espèce est chymivore c'est-à-dire qu'elle se nourrit du chyme intestinal. La fécondité de *T. colubriformis* n'est pas aussi importante que celle d'*H. contortus* et le nombre d'œufs excrétés par femelle est rarement supérieur à 100. La morphologie générale de ce nématode est présentée figure 5.

Les infestations d'ovins et de caprins par *T. colubriformis* sont souvent asymptomatiques. Lors d'importantes infestations les symptômes sont des diarrhées avec un amaigrissement de l'animal. Quelques cas de mortalité sont rencontrés lors d'infestations sévères.

II.3) Cycle biologique

Le cycle biologique des strongles digestifs est composé de deux phases : la première est libre où le ver se développe dans le milieu extérieur et la seconde est parasitaire où celui-ci a besoin d'un hôte pour se développer. Le cycle chez les trichostrongles est monoxène c'est-à-dire qu'il ne possède aucun hôte intermédiaire (Figure 6).

➤ La phase libre :

La phase libre ou exogène commence par la libération des œufs par les vers adultes dans le milieu extérieur (prairies, pâturages, etc.) *via* les fèces de l'hôte. Lorsque les conditions extérieures sont favorables (conditions de température et taux d'humidité de l'air), ces œufs s'embryonnent et éclosent en libérant une larve 1 (L₁). En à peine un à deux jours ces larves muent pour aboutir en L₂. Ces deux premiers stades larvaires se nourrissent de micro-organismes présents dans les matières fécales, ils sont très peu résistants aux conditions environnementales ce qui implique un fort taux de mortalité à ces stades. La larve L₂ subit ensuite une mue en larve L₃ qui est la larve infestante, cette mue est incomplète car la larve conserve son exuvie qui joue le rôle de gaine protectrice. Cette L₃ possède aussi des réserves lipidiques qui lui permettent de survivre pendant plusieurs mois dans le milieu extérieur. La

durée de passage du stade œuf en L₃ dépend des conditions extérieures mais en conditions optimales cette évolution se fait en 8 à 10 jours.

➤ La phase parasitaire :

Cette phase commence lorsque l'hôte ingère les larves infestantes L₃ présentes dans le milieu extérieur lors du pâturage. Les larves perdent leur gaine protectrice ce qui marque la transition de la période libre à la période parasitaire. Cette perte de gaine se fait dans l'organe qui précède celui où va s'installer le parasite (Hertzberg *et al.*, 2002). Les larves dégainées vont ensuite pénétrer la muqueuse et muer en larve de stade 4 (L₄). Ces L₄ évoluent soit en stade 5 juvénile ou, chez certaines espèces, elles vont s'enkyster dans la muqueuse digestive et retarder leur développement (phénomène d'hypobiose larvaire en hiver). Au cours du stade 5 les vers atteignent leur maturité sexuelle et sont adultes. Il faut environ trois semaines entre l'ingestion des larves L₃ et l'apparition des premiers œufs dans les matières fécales de l'hôte (hors hypobiose), cette période correspond à la période prépatente.

II.4) Moyens de luttés contre les strongles digestifs

Aujourd'hui l'infestation des élevages d'ovins et de caprins par une ou plusieurs espèces de strongles digestifs est un problème à l'échelle mondiale. En France il n'existe pas ou peu de fermes exemptes de nématodes parasites (Cabaret, 2004). Les pertes économiques engendrées par ces infestations ont une conséquence majeure sur la rentabilité des élevages. La lutte contre ces strongles est donc une priorité pour les éleveurs. Il existe actuellement plusieurs axes de lutte contre ces strongles digestifs :

➤ Lutter contre la source de contamination par des méthodes alternatives comme la gestion raisonnée des pâturages ou l'emploi de micro-organismes nématophages ou nématocides.

➤ Augmenter la résistance de l'hôte vis-à-vis de ces nématodes avec des procédés comme la sélection de races génétiquement résistantes ou la vaccination.

➤ L'utilisation de molécules chimiques de synthèse de types anthelminthiques pour éliminer les strongles déjà présents.

II.4.1) Lutte contre la source de contamination

➤ La gestion des pâturages est une solution qui a pour but d'éviter que les animaux se contaminent en se nourrissant sur des prairies infestées de larves (Cabaret *et al.*, 2002). Pour cela il faut que les animaux pâturent sur un terrain « propre », c'est-à-dire sur une parcelle exempte de larves infestantes ou n'en contenant qu'un très faible nombre. Pour obtenir une parcelle saine plusieurs méthodes sont possibles : une stratégie de type préventive où l'on met sur une parcelle déjà propre des animaux pas ou très peu parasités associée à un traitement anthelminthique afin de limiter la présence de L₃ sur ces parcelles. Une méthode dite d'évasion où l'on change les animaux de parcelle tous les ans afin d'éviter les contaminations d'une année sur l'autre. Une rotation des animaux sur une même parcelle permettra également d'éviter le problème de contamination, en effet les strongles ont une spécificité d'hôte et les larves infestantes issues d'une espèce de nématode de mouton ne pourront pas infester un bovin par exemple. Cependant il existe des espèces de nématodes ayant un spectre d'hôtes très large qui peuvent infester de nombreuses espèces de rente, c'est le cas de *Trichostrongylus axei* qui infeste la caillette des bovins, ovins, caprins et l'estomac des porcins et équins.

➤ La lutte contre les stades infestants des strongles digestifs peut également se faire par des méthodes agricoles de types mécaniques comme la pratique d'un labour entre les pâtures afin d'éliminer les larves présentes sur la parcelle. L'utilisation de composés chimiques est un procédé plus épisodique et controversé comme par exemple l'épandage de cyanamide calcique (puissant composé à propriétés herbicide, fongicide, nématicide, etc.).

➤ Une autre alternative pour lutter contre la contamination des petits ruminants au niveau du pâturage est le contrôle biologique. C'est-à-dire utiliser des agents vivants (que ce soit des bactéries ou des champignons) afin d'éliminer les larves présentes dans les pâtures. En effet des études réalisées avec le champignon nématophage *Duddingtonia flagrans* ont montré que celui-ci avait la capacité de réduire le nombre de larves infestantes sur les pâtures et donc de réduire les infections sévères chez les animaux (Waller *et al.*, 2004b). De plus ce champignon ne semble pas avoir d'effet délétère envers les nématodes libres (Knox *et al.*, 2002). Les spores de *D. flagrans* ingérées par voie orale par les animaux réduit de près de 80% le nombre de larves retrouvées dans les fèces (Larsen *et al.*, 1998). *D. flagrans* n'est pas le seul champignon à avoir des propriétés nématicides *Monacrosporium eudermatum*,

Arthrobotrys oligospora ont également montré une réduction des larves d'*H. contortus* de plus de 90% (Mendoza-De Gives & Vazquez-Prats, 1994).

Certaines bactéries produisent des cristaux protéiques toxiques pour les nématodes (Feitelson *et al.*, 1992). Ces cristaux sont efficaces contre les trois espèces majeures de strongles (*H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis*) (Kotze *et al.*, 2005). Cette toxine inhibe à la fois le développement des larves et tue les nématodes adultes. Les résultats observés montrent qu'elle est aussi efficace que les traitements anthelminthiques actuels. Récemment des expériences ont montré que des isolats de *Caenorhabditis elegans* résistants aux benzimidazoles et au lévamisole restent sensibles à l'effet de ces cristaux ce qui en fait une excellente alternative aux traitements anthelminthiques dans le cas de multirésistances (Hu *et al.*, 2010).

II.4.2) Augmentation de la résistance de l'hôte

Plusieurs procédés sont possibles afin d'augmenter la résistance de l'hôte face aux strongles. La sélection de races génétiquement résistantes aux strongles, la vaccination ou l'apport de compléments alimentaires peuvent jouer un rôle sur la sensibilité de l'hôte vis-à-vis du parasite.

➤ La sélection de races génétiquement résistantes aux infestations par les strongles est apparue en Australie et Nouvelle-Zélande. La résistance de l'animal est estimée par des examens coproscopiques et est héritable (Stear *et al.*, 1999). Cependant cette sélection nécessite de nombreuses années de croisements de races avant d'être effective. La race obtenue doit également avoir des critères compatibles avec les élevages (poids, production de lait, etc.). De plus il existe des isolats capables de contourner cette résistance génétique de l'hôte, c'est-à-dire de s'installer et de se développer.

➤ La vaccination est une mesure prophylaxique qui consiste à introduire un antigène destiné à stimuler le système immunitaire afin d'induire une protection et de limiter le niveau d'infestation des animaux. Le premier vaccin anti nématodes testé a été fabriqué à partir de larves de *Dictyocaulus viviparus* irradiées. Des essais similaires ont été réalisés chez les strongles digestifs *H. contortus* et *T. colubriformis* avec des résultats non concluants en conditions naturelles d'infestation et une réponse de l'hôte âge dépendant (pour revue (Smith, 1999)). Il existe trois grandes catégories d'antigènes testés à l'heure actuelle comme antigènes potentiels : l'homogénat total de vers, les antigènes naturels et les antigènes « cachés ».

➤ La vaccination par un homogénat de vers consiste à injecter des antigènes de faible poids moléculaire à des ovins. Ce type de vaccination a été testé avec *H. contortus* et a montré qu'elle était efficace avec une réduction de 99,9% d'œufs dans les fèces et de 97,6% de parasites dans la caillette. Le problème avec ce type de vaccination est que la variabilité est grande entre les animaux testés et que 25% des ovins vaccinés ne sont pas protégés contre le nématode (Schallig & Van Leeuwen, 1997).

Les antigènes naturels sont en fait ceux que l'hôte rencontre durant une infestation classique, ils sont généralement issus des produits d'excrétion-sécrétion. Ils ont donc l'avantage d'être potentiellement exposés au système immunitaire de l'hôte. Des essais ont été réalisés chez *H. contortus* avec deux protéines de 15 et 24 kDa (ES15 et ES24), isolées des produits d'excrétion-sécrétion et produites sous formes recombinantes (Schallig *et al.*, 1997b). Cette étude a montré une réduction du nombre de vers et de l'excrétion des œufs au niveau des fèces de 70 % (Schallig *et al.*, 1997a). Cependant la protection induite par ces deux antigènes est en fait âge dépendante car pour les ovins de trois mois, aucune réduction de la charge parasitaire n'a été observée (Vervelde *et al.*, 2002). Dans certaines autres études une fraction entière des produits d'excrétion sécrétion est utilisée avec des réductions de l'excrétion d'œufs dans les selles et d'installation des larves de près de 50% (Bakker *et al.*, 2004). Des expériences similaires ont été réalisées avec *T. colubriformis* chez le cobaye avec des antigènes allant de 11 kDa à 94 kDa avec des protections rarement supérieures à 50% (O'Donnell *et al.*, 1989, Dopheide *et al.*, 1991).

En opposition aux antigènes naturels c'est-à-dire ceux qui sont susceptibles d'être en contact avec le système immunitaire de l'hôte, il existe des antigènes dit « cachés » c'est-à-dire non reconnus par l'hôte après infestation. Cette méthode n'est viable que sur les nématodes parasites hématophages, comme *H. contortus*, qui en ingérant le sang de leur hôte exposent leur surface intestinale aux immunoglobulines et donc à des anticorps spécifiquement dirigés contre ses propres constituants (Knox *et al.*, 2003). Les principaux antigènes cachés rencontrés à ce jour sont des enzymes impliquées dans la digestion du sang. Les anticorps inhibent l'action des enzymes, il n'y a donc plus d'absorption des nutriments ce qui conduit à l'élimination des vers. Ce type de vaccin n'est donc pas à but prophylactique mais thérapeutique puisque celui-ci n'empêche pas les larves de s'installer dans l'hôte. Plusieurs glycoprotéines intestinales sont étudiées, parmi elle la protéine H11 est la plus prometteuse. C'est une glycoprotéine membranaire de 110 kDa qui est exprimée par les

microvillosités intestinales durant les stades parasitaires. La vaccination avec cette protéine diminue l'excrétion d'œufs dans les matières fécales de plus de 90% et le nombre de vers présents dans la caillette de plus de 80% (Smith *et al.*, 1993). Les protéines utilisées lors de cette étude proviennent d'extraction de vers, la production de cette protéine par des systèmes hétérologues ne donne pas les mêmes taux de protection ce qui constitue un problème majeur et une limite à cette technique (Murray *et al.*, 2007).

➤ L'infestation des ovins par des nématodes induit un déficit alimentaire notamment au niveau protéique (Bown *et al.*, 1991). Des études ont montré que la supplémentation en protéines améliore la résistance des animaux aux infestations et favorise l'acquisition de l'immunité protectrice (Coop & Holmes, 1996, Etter *et al.*, 2000).

Tableau IV : Principaux anthelminthiques utilisés en médecine vétérinaire en France (source : Dictionnaire des médicaments vétérinaires, 15^{ème} édition, 2009)

Familles	Molécule(s)	Spectre d'utilisation	Nom déposé	Cible pharmacologique	Spectre d'activité
Benzimidazoles	Albendazole	Bovin, Ovin, Caprin	Valbazen [®]	-tubuline	Nématodes gastro-intestinaux
	Fendendazole	Bovin, Ovin, Caprin, Porcin, Equin, Chien	Panacur [®]		Strongles pulmonaires
	Oxfendazole	Bovin, Ovin, Caprin, Chien	Synanthic [®]		Cestodes
Pro-benzimidazoles	Nétobimin	Bovin, Ovin	Hapadex [®]		Douves (Albendazole & Nétobimin)
Cyclooctadepsipeptides	Emodepside	Chat	Profender [®] (+Praziquantel)	Récepteur à la sécrétine	Nématodes gastro-intestinaux
Dérivés aminoacétonitrile	Monepantel	Ovin	Zolvix [®]	Récepteur nicotinique à l'acétylcholine sous type DEG3	Nématodes gastro-intestinaux
Dérivés de la Pyrazinoisoquinoline	Praziquantel	Ovin, Equin, Chien, Chat	Cestocur [®]	Perméabilité des membranes aux ions calcium	Cestodes
Imidazothiazoles	Levamisole	Bovin, Ovin, Caprin, Porcin, Aviaire, Chat, Chien	Némisol [®]	Récepteur nicotinique à l'acétylcholine	Nématodes gastro-intestinaux Strongles pulmonaires
Lactone macrocyclique	Doramectine	Bovin, Ovin, Porcin	Dectomax [®]	Canaux chlore	Nématodes gastro-intestinaux
	Ivermectine	Bovin, Ovin, Porcin, Equin	Ivomec [®]		Strongles pulmonaires
	Moxidectine	Bovin, Ovin, Equin, Chat, Chien	Cydectine [®]		Ectoparasites
Piperazine	Piperazine	Bovin, Porcin, Equin, Aviaire, Chat, Chien	Soluverm [®]	Récepteur GABA	Ascaris
Salicylanides	Closantel	Bovin, Ovin	Flukiver [®]	Membrane mitochondriale	Trématodes
	Nitroxinil	Bovin, Ovin, Chien	Dovenix [®]		Nématodes hématophages
Tétrahydropyrimidines	Pyrantel	Equin, Chat, Chien	Strongid [®]	Récepteur nicotinique à l'acétylcholine	Nématodes gastro-intestinaux
	Oxantel	Chien	Dolpac [®] (+Pyrantel +Praziquantel)		Trichures

III) Les anthelminthiques & mécanismes de résistance associés

Les stratégies alternatives de lutte contre les strongles digestifs sont donc pour la majorité en cours d'étude ou de développement et donc ne sont pas appliquées concrètement aujourd'hui dans les élevages. L'utilisation de molécules aux propriétés anthelminthiques reste à l'heure actuelle le moyen de lutte contre les nématodes parasites le plus utilisé. Cependant l'apparition de résistances à ce type de composés dans de nombreux élevages compromet l'utilisation de certains traitements nématocides. L'identification de nouveaux composés et la compréhension des mécanismes de résistance est importante pour raisonner l'utilisation de ces molécules et éviter la sélection d'isolats résistants.

III.1) Historique, définition & présentation générale

Un anthelminthique est un composé naturel ou chimique de synthèse qui a une action paralysante ou létale sur les helminthes afin de débarrasser un organisme d'une infestation parasitaire. Les anthelminthiques sont utilisés aussi bien chez l'Homme, les animaux domestiques compagnons ou les animaux de rente. Un anthelminthique idéal doit être multivalent (efficace sur plusieurs espèces de parasites), non-toxique pour l'hôte, rapidement éliminé par l'hôte (notamment pour les animaux de rente), facile d'utilisation (pour les éleveurs) et bon marché. En 1999, les antiparasitaires représentaient 13% du budget d'un élevage (Witty, 1999).

La découverte du premier anthelminthique : la phénothiazine date de 1883, il servait à la fois d'insecticide et d'anthelminthique. Les premières utilisations de ce composé dans un cadre vétérinaire ont été rapportés en 1939 contre des parasites de ruminants et de chevaux (Gordon, 1939, Lanusse & Prichard, 1993). Cette molécule avait un faible spectre d'activité, de plus son coût de production et donc de vente était élevé ; elle pouvait aussi être toxique selon ses conditions de fabrication ou de stockage. Avec l'apparition de nématodes résistants (Drudge *et al.*, 1957), cette molécule fut remplacée progressivement par des molécules moins onéreuses et plus efficaces. Il existe plusieurs familles d'anthelminthiques classées selon leur nature chimique et leur mode d'action (Tableau IV).

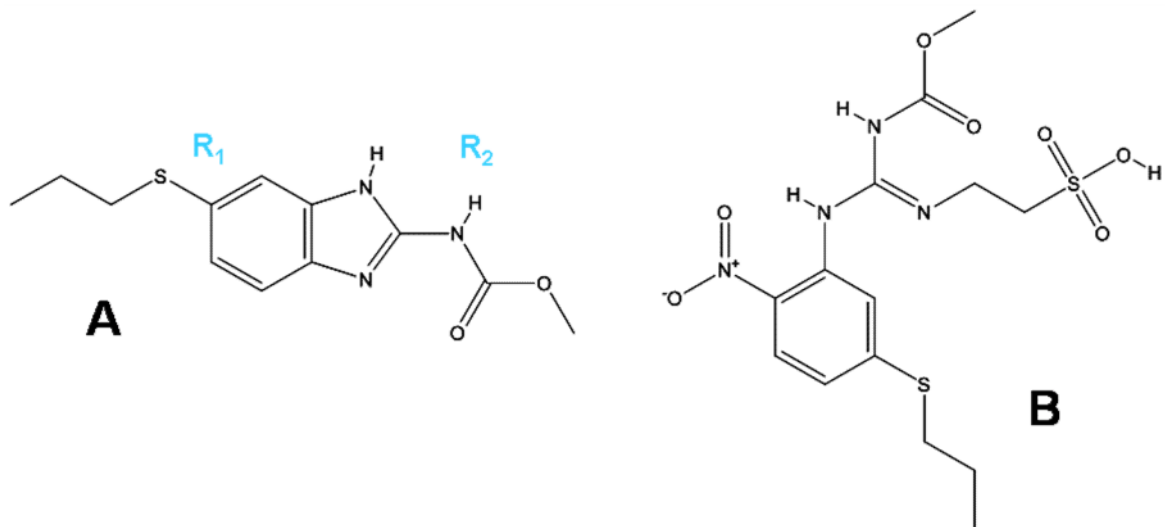


Figure 7 : Structure chimique des benzimidazoles. A : structure chimique du benzimidazole : albendazole. B : structure chimique d'un pro-benzimidazoles : n etobimin.

Toutes ces familles de molécules ne sont pas utilisées à la même fréquence. Il existe trois grands groupes qui sont principalement utilisés dans la lutte contre les strongles digestifs dans les élevages : les benzimidazoles, les lactones macrocycliques et les agonistes cholinergiques (imidazothiazoles et tétrahydropyrimidines). Cependant aujourd'hui l'apparition de résistances à ces trois types de molécules est fréquente, de nouvelles classes d'anthelminthiques comme les dérivés d'aminocétonitriles prennent donc de l'importance.

D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS) la résistance peut se définir par « la capacité, acquise génétiquement, d'individus d'une population à résister à des doses d'antiparasitaires normalement létales pour la majorité des individus de cette espèce ». La capacité de résistance d'un individu est due à la modification de son matériel génétique.

III.2) Les benzimidazoles

III.2.1) Présentation

En 1963, le thiabendazole est la première molécule possédant un noyau benzène introduite sur le marché. Cette molécule possède des propriétés antifongiques ainsi que des propriétés anthelminthiques à large spectre d'activité (Conway, 1964). Rapidement de nombreux composés dérivant de la même structure chimique sont arrivés : la parabendazole (1968), le mébendazole (1972), l'albendazole (1976), etc. La structure générale d'un benzimidazole est un double cycle composé d'un noyau benzène fusionné avec un hétérocycle. La substitution des groupements en positions R_1 et R_2 permet d'obtenir les différentes molécules utilisées en thérapeutique (Townsend & Wise, 1990).

Ce sont les anthelminthiques les plus utilisés actuellement du fait de leur faible coût de production et de leur indice thérapeutique élevé. Le groupe des benzimidazoles est divisé en deux parties :

➤ Les benzimidazoles classiques sont composés de nombreuses molécules possédant toutes un noyau benzénique, elles sont actives sous leur forme première et sont administrées uniquement par voie orale (Figure 7A).

➤ Les pro-benzimidazoles constituent un groupe de prodrogue c'est-à-dire que la molécule ne devient active qu'après métabolisation par l'organisme de l'animal (Figure 7B). Ces molécules présentent une meilleure solubilité dans l'eau et une absorption plus importante. De plus, elles ont l'avantage d'être moins toxiques pour l'hôte (Horton, 1990).

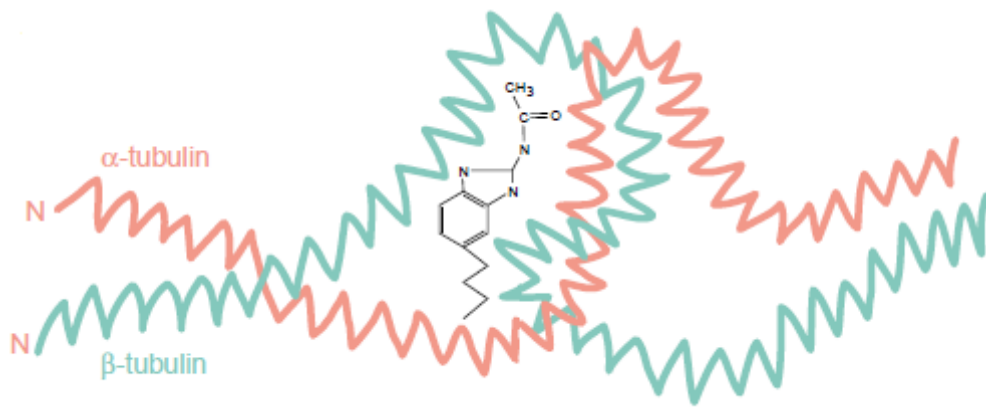


Figure 8 : Mode d'action d'une molécule de benzimidazole (d'après (Prichard, 2001))

III.2.2) Mode d'action des benzimidazoles

La cible pharmacologique des benzimidazoles est la β -tubuline, une protéine de 50 kDa qui s'associe avec l' α -tubuline pour former les microtubules. Ces microtubules sont des constituants essentiels du cytosquelette de la cellule et jouent de nombreux rôles dans l'architecture de la cellule ou encore la formation des fuseaux mitotiques. L'action des benzimidazoles empêche l'association de l' α -tubuline et de la β -tubuline ce qui provoque une dépoléarisation des microtubules au niveau du cytoplasme des cellules intestinales ou tégumentaires du nématode (Van den Bossche & De Nollin, 1973, Van den Bossche *et al.*, 1982) (Figure 8).

Dans la cellule, ces molécules entrent en compétition avec la colchicine (protéine impliquée dans la mitose), et provoquent des dysfonctionnements cellulaires tels que l'inhibition de la sécrétion des protéines, la perte de la captation du glucose et l'épuisement du glycogène (Lacey, 1990, Beugnet *et al.*, 1996) pour revue (Martin, 1997). Ces composés ne sont pas toxiques pour les mammifères car les benzimidazoles présentent une affinité de 250 fois à 400 plus importante pour la β -tubuline des nématodes que celle des mammifères.

III.2.3) Mécanismes de résistance aux benzimidazoles

La première notification de résistance aux benzimidazoles date de 1968 pour *Haemonchus contortus* et 1970 pour *Trichostrongylus colubriformis* (Smeal *et al.*, 1968, Hotson *et al.*, 1970). La résistance est apparue peu de temps après la mise sur le marché du composé (de 3 à 5 ans). Ce phénomène de résistance est très répandu et retrouvé en Europe : (Britt, 1982, Bauer *et al.*, 1986) ; en Afrique (Van Wyk *et al.*, 1999) ; en Amérique du sud (Waller *et al.*, 1996).

La vitesse ainsi que la fréquence d'apparition de la résistance suggèrent un mécanisme de résistance assez simple. La β -tubuline chez les nématodes possède deux isotypes I et II codés par deux gènes différents. Des études réalisées chez *H. contortus* ont montré une corrélation entre le phénotype de résistance et la diminution de la fréquence de différents allèles des deux isotypes du gène de la β -tubuline (Kwa *et al.*, 1993, Beech *et al.*, 1994). D'autres expériences ont mis en évidence la présence de polymorphismes nucléotidiques dans la séquence du gène associés au phénotype de résistance. Ces mutations entraîneraient une perte d'affinité de la molécule pour la protéine cible mutée.

Trois grandes mutations ont été identifiées sur un ou sur les deux isotypes du gène de la α -tubuline en position 167, 198 et 200 mais d'autres polymorphismes potentiellement impliqués dans la résistance ont été découverts (de Lourdes Mottier & Prichard, 2008). La mutation la plus étudiée est la substitution d'une phénylalanine par une tyrosine en position 200 (F200Y) de l'isotype I ou II du gène chez plusieurs espèces de Trichostrongles : *H. contortus* (Kwa *et al.*, 1994), *Teladorsagia circumcincta* (Elard *et al.*, 1996), *T. colubriformis* (Silvestre & Humbert, 2002), *Trichostrongylus axei* (Palcy *et al.*, 2010). De la même façon que pour la mutation 200 une seconde substitution d'une phénylalanine par une tyrosine ou une histidine a été décrite en position 167 (F167Y) chez les espèces *H. contortus* et *T. circumcincta* (Silvestre & Cabaret, 2002). Plus récemment une troisième mutation dans l'isotype I, observée en Afrique du sud et en Australie, semble contribuer à la résistance aux benzimidazoles chez *H. contortus*, il s'agit d'une substitution d'un résidu glutamate en alanine en position 198 (E198A) (Ghisi *et al.*, 2007, Von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007). Cette dernière mutation a également été retrouvée chez un isolat d'*H. contortus* résistant aux benzimidazoles sélectionné *in vitro* (Rufener *et al.*, 2009a). Toutes ces substitutions d'acides aminés résultent d'une mutation point au niveau de la séquence nucléotidique.

Une étude réalisée chez *H. contortus* a mis en évidence un autre mécanisme potentiel de résistance aux benzimidazoles. Le phénotype de résistance serait lié à l'expression d'une P-glycoprotéine, pompe d'efflux, qui transporterait de manière non spécifique la molécule en dehors de la cellule empêchant ainsi son action sur la α -tubuline du nématode (Blackhall *et al.*, 2008).

III.3) Les lactones macrocycliques

III.3.1) Présentation

Il existe deux grands groupes dans les lactones macrocycliques : les avermectines et les milbemycines. Les molécules composant ces deux classes possèdent des activités anthelminthiques, insecticides ainsi que anti-acariens. C'est la seule classe utilisée comme traitement antiparasitaire aujourd'hui qui est active contre les ectoparasites (tiques et acariens). Les avermectines et les milbemycines ont pour la première fois été isolés de la fermentation d'un petit champignon du sol respectivement *Streptomyces avermitilis* et

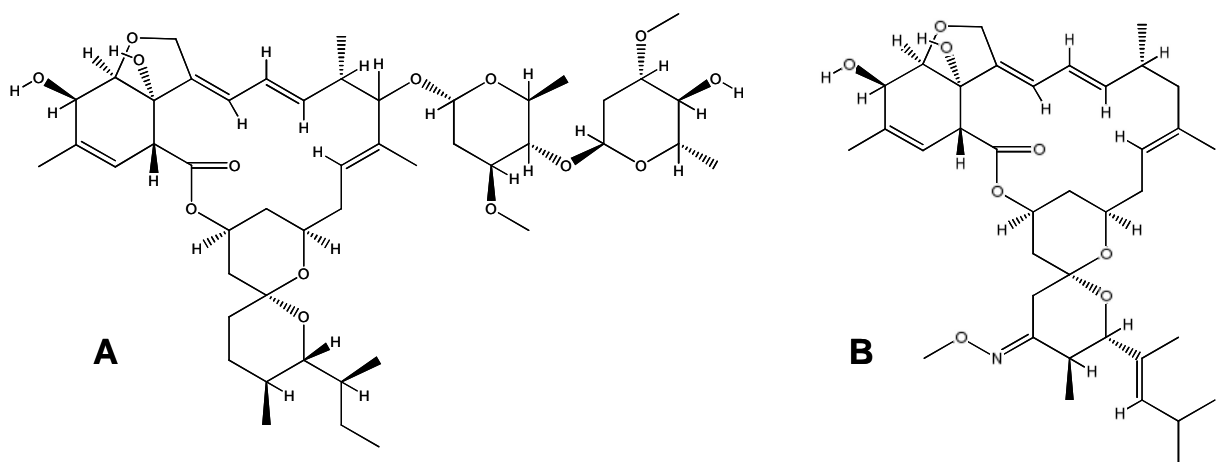


Figure 9 : Structure chimique des lactones macrocycliques. A : structure d'une avermectine : l'ivermectine. B : structure d'une milbemycine : moxidectine.

Streptomyces cyonogriseus. Les composés naturels ainsi obtenus sont chimiquement modifiés afin d'obtenir des principes actifs plus efficaces.

L'ivermectine est le premier composé dérivé de cette famille à être commercialisé au début des années 80 (Campbell *et al.*, 1983) (Figure 9A). Cette molécule est celle qui possède le plus large spectre d'hôte. Puis d'autres molécules ont suivi comme :

- L'abamectine : plus efficace sur les nématodes mais moins sur les arthropodes.
- La doramectine : possédant le même spectre d'action que l'ivermectine mais avec une demi-vie tissulaire plus longue.
- L'éprinomectine : se retrouvant en faible concentration dans le lait et donc utilisable chez les femelles laitières.

Le nombre de molécules commercialisées du groupe des milbemycines est plus restreint puisque à l'heure actuelle, en France, une seule molécule est utilisée : la moxidectine depuis 1995 (Figure 9B). Cette molécule a un large spectre d'action et n'est pas toxique pour certaines races de chien comme peuvent l'être les avermectines.

III.3.2) Mode d'action des lactones macrocycliques

Les effets de ces composés sur le nématode sont une paralysie du pharynx (Geary *et al.*, 1993, Brownlee *et al.*, 1997, Pemberton *et al.*, 2001) et des muscles du corps (Kass *et al.*, 1980). La cible et donc le mode d'action des lactones macrocycliques sont très controversés, il semble en effet que ces composés agissent sur plusieurs cibles. Néanmoins les avermectines / milbemycines ont le même mode d'action (Conder *et al.*, 1993, Shoop *et al.*, 1995).

➤ Au début de l'étude du mode d'action des avermectines, le récepteur à l'acide - amino butyrique (GABA) était un bon candidat en tant que cible pharmacologique car il joue un rôle directe dans la locomotion du nématode (McIntire *et al.*, 1993). Cependant les doses nécessaires pour bloquer le récepteur GABA *in vitro* était trop importantes par rapport à celle administrées *in vivo*, ce qui indique que le récepteur GABA n'est pas la cible principale de la molécule (Martin & Pennington, 1989, Schaeffer & Haines, 1989).

D'autres études ont montré que les avermectines ont des cibles un peu plus particulières comme le canal chlore histamine dépendant (Zheng *et al.*, 2002), le récepteur à la glycine (Shan *et al.*, 2001) ou encore les récepteurs P2X₄ (Khakh *et al.*, 1999). L'expression du

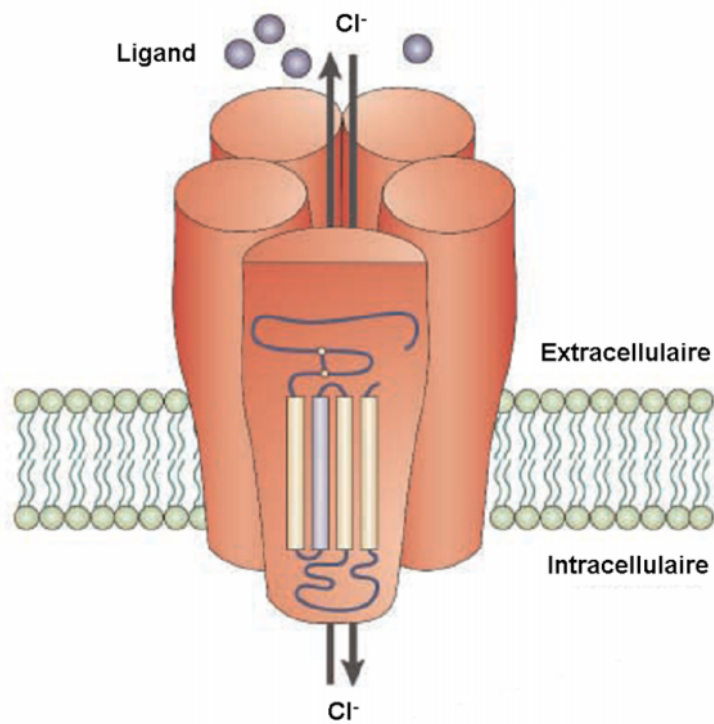


Figure 10 : Schéma d'un récepteur au glutamate d'après (Raymond & Sattelle, 2002) Les 5 sous-unités de ce récepteur sont représenté en orange, le ligand par des cercles bleus et les ions chlorure sont représentés par Cl^- .

récepteur nicotinique à l'acétylcholine 7 humain ou du poulet en systèmes hétérologues (œufs de xénope ou en cellules K-28) montrent que l'ivermectine améliore le courant induit par l'acétylcholine sur ces deux récepteurs (Krause *et al.*, 1998).

➤ Les lactones macrocycliques peuvent interagir avec de nombreux récepteurs présents chez les parasites. Cependant ces molécules montrent une affinité beaucoup plus importante pour les canaux chlorure glutamate dépendants (GluCl-R) (Figure 10) que pour les autres cibles potentielles citées précédemment (McCavera *et al.*, 2009). Chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*, des études ont montré que ce récepteur est un pentamère composé de deux sous-unités différentes : GluCl- et GluCl- (Cully *et al.*, 1994). Les lactones macrocycliques agissent sur le GluCl-R comme cible première ce qui entraîne deux effets chez le nématode : l'arrêt du mécanisme de pompage au niveau du pharynx et une paralysie locomotrice (pour revue (Wolstenholme & Rogers, 2005)).

Chez *C. elegans* deux gènes *avr-15* et *glc-2* codant respectivement pour des sous-unités et du GluCl-R sont exprimés dans les cellules du pharynx du nématode (Dent *et al.*, 1997, Laughton *et al.*, 1997). Les lactones macrocycliques activent les récepteurs GluCl présents ce qui provoque une dépolarisation du muscle dû à une forte concentration en ions chlorures et à un arrêt de l'action de pompage au niveau du pharynx. Chez *H. contortus* il a été montré que seule la sous-unité est retrouvée au niveau du pharynx (Forrester *et al.*, 1999, Portillo *et al.*, 2003). Le rôle de la sous-unité GluCl- du récepteur reste encore méconnu (Delany *et al.*, 1998).

Le second effet de paralysie observé au niveau de la locomotion est un effet indirect des lactones macrocycliques puisqu'elle nécessite une concentration cent fois supérieure de principe actif que pour la paralysie du pharynx (Geary *et al.*, 1993). Deux types de motoneurones (excitateur ou inhibiteur) sont retrouvés sur les cordes dorsales ou ventrales du nématode. Lors d'une locomotion normale les muscles dorsaux sont contractés alors que les ventraux sont relâchés et *vice versa* ce qui permet de créer le mouvement. La présence de récepteurs GluCl sur ces motoneurones empêche ce phénomène de locomotion en cas de traitement (Portillo *et al.*, 2003). Chez *C. elegans* les gènes *avr-14* et *glc-1* sont directement impliqués dans ce processus (Dent *et al.*, 2000).

III.3.3) Mécanismes de résistance aux lactones macrocycliques

Les lactones macrocycliques appartiennent à une famille d'anthelminthiques à large spectre d'action, très utilisés à l'heure actuelle que ce soit en médecine vétérinaire ou humaine. Cependant comme pour les benzimidazoles, des populations de nématodes résistantes à ce type de molécules sont apparues à travers le monde aussi bien dans l'hémisphère sud (Carmichael *et al.*, 1987, Gopal *et al.*, 1999, Cezar *et al.*, 2010) que dans l'hémisphère nord (Jackson *et al.*, 1992, Maingi *et al.*, 1996).

La résistance aux lactones macrocycliques semble être aussi complexe que son mode d'action. En effet des études montrent qu'il existe plusieurs phénotypes associés à la résistance ce qui suggère que plusieurs mécanismes sont impliqués (Gill *et al.*, 1998). Chez *C. elegans* des nématodes fortement résistants aux lactones macrocycliques possèdent des mutations dans trois gènes (*avr-14*, *avr-15* & *glc-1*) correspondant à des sous-unités du récepteur GluCl (Dent *et al.*, 2000). Chez le nématode parasite *H. contortus*, 2 mutations présentes sur 2 gènes différents ont été identifiées comme potentiellement impliquées dans la résistance aux lactones macrocycliques : la substitution d'une alanine par une valine en position 169 (A169V) sur le gène *glc-5* qui code une sous-unité du récepteur GluCl, ainsi que la substitution d'une lysine par une arginine en position 169 (K169R) sur le gène *lgc-37* qui code une sous-unité du récepteur GABA (Beech *et al.*, 2010a). Cependant aucune expérience de validation fonctionnelle n'a été réalisée afin de confirmer ou d'infirmer l'implication de ces polymorphismes dans le phénotype de résistance.

Chez les nématodes parasites, la résistance aux lactones macrocycliques a aussi été reliée à l'augmentation de l'expression d'une pompe d'efflux de type P-glycoprotéine (Pgp). Ces Pgp sont de grosses protéines d'environ 140 kDa comprenant douze domaines transmembranaires, elles permettent de détoxifier les cellules en effluant les composés toxiques à l'extérieur de la cellule. Ce mécanisme est dit aspécifique car ces Pgp peuvent effluer un grand nombre de composés ayant les mêmes propriétés chimiques. Chez *H. contortus* il semble que la Pgp-A soit responsable de l'efflux des lactones macrocycliques (Blackhall *et al.*, 1998, Xu *et al.*, 1998). Cependant cette résistance peut être inversée par l'utilisation d'inhibiteur de Pgp tel que le Verapamil® (Molento & Prichard, 1999).

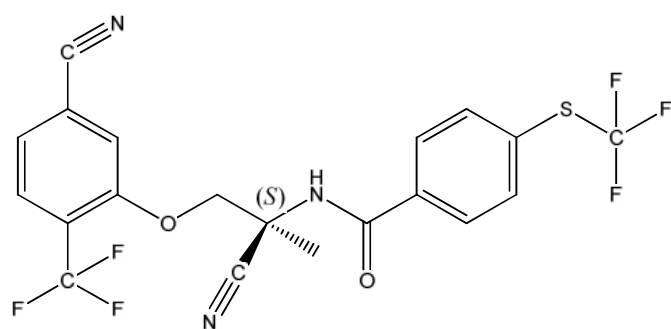


Figure 11 : Structure chimique d'un dérivé aminoacétonitrile : le monopantel.

III.4) Les dérivés d'aminocétonitrile

III.4.1) Présentation

Pendant longtemps le traitement des vers parasites dans les élevages d'ovins et de caprins s'est résumé à l'utilisation de trois grandes familles d'anthelminthiques : les benzimidazoles, les lactones macrocycliques et les agonistes cholinergiques. L'apparition de résistances à ces différentes familles s'est développée au fur et à mesure de leur utilisation. Certains isolats montraient des résistances à plusieurs familles en même temps (Kaplan, 2004, Sargison *et al.*, 2010). Il était donc nécessaire d'avoir accès à de nouvelles molécules avec un mode d'action et une cible pharmacologique différents.

En 2008, la société Novartis a mis sur le marché un dérivé d'aminocétonitrile (Amino Acetonitrile Derivates : AAD), le monepantel, efficaces contre des souches de nématodes résistantes aux autres molécules (Kaminsky *et al.*, 2008, Hosking *et al.*, 2010) (Figure 11).

III.4.2) Mode d'action des dérivés d'aminocétonitrile

Chez *C. elegans*, les AADs ciblent un récepteur à l'acétylcholine (AChR) de sous-type DEG-3. Chez *C. elegans*, la famille des sous-unités DEG-3 comporte plusieurs gènes tels que *des-2*, *acr-20* et *acr-23* (Jones *et al.*, 2007). Ce sous-type particulier de récepteur n'est pas présent chez les mammifères ce qui en fait une cible très intéressante pour les anthelminthiques car non toxiques pour l'hôte. Les molécules issues des AADs possèdent une fonction cholinergique : elles se fixent sur le récepteur avec un délai plus important que l'agoniste naturel et provoque par une entrée d'ions une contraction musculaire permanente et une paralysie du nématode au niveau des muscles du corps laissant la tête et la queue mobile.

III.4.3) Mécanismes de résistance des dérivés d'aminocétonitrile

Des études réalisées sur des souches de *H. contortus* résistantes aux AADs obtenues *in vitro* ont montré que trois gènes sont potentiellement impliqués dans la résistance à ce composé (Rufener *et al.*, 2009b). Il s'agit de trois gènes codant des sous-unités d'AChR *Hco-des-2*, *Hco-deg-3* et *Hco-mpt1-1* (MonePanTeL), l'expression de ces trois sous-unités est diminuée chez une souche résistante par rapport à la souche sensible. De plus, ces études ont montré que deux de ces gènes (*Hco-des-2* et *Hco-mpt1-1*) sont affectés par des phénomènes d'épissage alternatif provoquant des pertes d'exons et en général l'apparition d'un codon stop

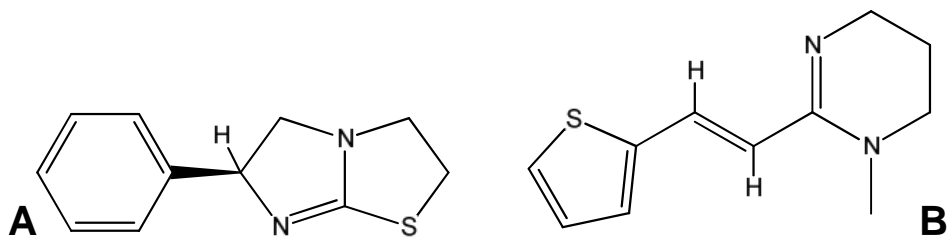


Figure 12 : Structure chimique des agonistes cholinergiques. A : structure des imidazothiazoles : le lévamisole. B : structure d'un tétrahydropyrimidine : le pyrantel.

prématuré. Les protéines tronquées pourraient perturber l'assemblage ou le fonctionnement du récepteur.

Chez *C. elegans*, des expériences de reconstitution de récepteur en œufs de xénope ont montré que les deux sous-unités DES-2 et DEG-3 forment un hétéropentamère perméable aux ions calcium et sensible à la choline (Treinin *et al.*, 1998, Yassin *et al.*, 2001). Chez *H. contortus* un récepteur composé des deux sous-unités DES-2 et DEG-3 a été reconstitué récemment. Ce récepteur est, comme chez *C. elegans*, sensible à la choline et l'ajout de monepantel retarde le phénomène de désensibilisation du récepteur (Rufener *et al.*, 2010a).

A l'heure actuelle la composition du récepteur sensible au monepantel reste méconnue. Une étude montre que chez de nombreuses espèces de nématode, *acr-23* est une sous-unité importante pour la sensibilité du récepteur aux AADs (Rufener *et al.*, 2010b). Chez le strongle digestif *H. contortus* sensible au monepantel, le plus proche homologue d'*acr-23* est le gène *Hco-mptl-1*. Celui-ci semble jouer un rôle important dans la sensibilité aux monepantel (Rufener *et al.*, 2009b). Le rôle de chaque gène identifié dans la composition du récepteur au monepantel reste à déterminer.

III.5) Les agonistes cholinergiques

III.5.1) Présentation

Les agonistes cholinergiques désignent les composés ou familles de composés qui reproduisent l'effet de l'acétylcholine. Les imidazothiazoles et les tétrahydropyrimidines sont les deux familles qui composent ce groupe. Bien que leurs structures chimiques soient différentes, ces deux familles sont généralement associées car elles possèdent le même mode d'action et ciblent les mêmes types de récepteurs (Harrow & Gration, 1985, Atchison *et al.*, 1992). Il existe peu de molécules issues de ces familles utilisées actuellement sur le marché : le lévamisole / tétramisole pour les imidazothiazoles et les pyrantel / morantel pour le tétrahydropyrimidines (Figure 12).

L'utilisation du lévamisole et du tétramisole comme molécules anthelminthiques en médecine vétérinaire remonte au milieu des années 60 (Guilhon, 1966, Turton, 1969). C'est à cette même période que sont apparus le pyrantel et le morantel (Cornwell, 1966, Cornwell & Jones, 1970). Ces composés sont utilisés à l'heure actuelle aussi bien en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine. Dans un cadre vétérinaire le lévamisole et le pyrantel sont utilisés

pour leur propriétés anthelminthiques dans les élevages (bovins, ovins, caprins, porcins, équins) ainsi que pour les animaux domestiques (chien, chat). En médecine humaine ces composés sont utilisés comme anthelminthiques (Montresor *et al.*, 2002). Le lévamisole peut également être utilisé comme immunostimulateur dans le traitement de certains cancers (Sajid *et al.*, 2006).

III.5.2) Mode d'action des agonistes cholinergiques

Ces deux familles de molécules possèdent une cible pharmacologique proche. Ces composés agissent comme acétylcholinomimétiques c'est-à-dire qu'ils miment l'effet de l'acétylcholine sur les récepteurs cholinergiques de type nicotinique. Ils ciblent un sous-type d'AChR qui se trouve dans les cellules musculaires du nématode (Aubry *et al.*, 1970, Coles *et al.*, 1975). Chez *C. elegans*, il a été montré que le récepteur sensible au lévamisole est composé de cinq sous-unités différentes UNC-38, UNC-29, LEV-1, UNC-63 et LEV-8 (Fleming *et al.*, 1997, Culetto *et al.*, 2004, Towers *et al.*, 2005).

Aux doses thérapeutiques, le lévamisole et le pyrantel activent spécifiquement les AChRs des nématodes. Cette spécificité est liée à des différences d'acides aminés présents au niveau de la séquence des sous-unités du récepteur des nématodes et des mammifères. Ces différences jouent un rôle important au niveau de l'affinité de ces composés pour leur cible. En effet, des études réalisées sur le récepteur de souris exprimé en cellules HEK293 ont montré que le remplacement d'une glycine (G) par un glutamate (E) en position 153, sur la sous-unité du récepteur, augmente l'affinité du lévamisole pour ce récepteur (Rayes *et al.*, 2004). Pour le pyrantel / morantel une augmentation de l'affinité a été observée d'une part avec la même mutation que le lévamisole (G153E) ainsi que le remplacement d'une glutamine (Q) par une glycine en position 57 sur un récepteur γ (Bartos *et al.*, 2006, Bartos *et al.*, 2009). Les auteurs suggèrent que transposer au nématode modèle *C. elegans*, la G57 nécessaire à l'action des tétrahydropyrimidines se trouverait sur la sous-unité UNC-38 et le E153 se trouverait sur la sous-unité UNC-63 du récepteur (pour revue voir (Martin & Robertson, 2007)).

Chez le nématode, lorsque le récepteur à l'acétylcholine sensible au lévamisole est activé, l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau d'une jonction neuromusculaire provoque une libération d'acétylcholine qui se fixe sur les AChRs situés sur la membrane post-synaptique provoquant l'ouverture des canaux nicotiques et l'entrée de cations. Ce flux entrant de charges positives entraîne l'initiation d'un potentiel d'action musculaire qui se répand dans

toute la fibre et entraîne l'ouverture des canaux calciques. La cascade biochimique impliquant notamment les protéines contractiles des myofibrilles aboutit à une contraction musculaire (Aceves *et al.*, 1970).

Des études réalisées chez le nématode parasite du porc *Ascaris suum* ont montré que la fixation du pyrantel provoque une dépolarisation de la membrane 100 fois plus importante comparée à l'acétylcholine. Ainsi qu'une augmentation de la perméabilité par ouverture non sélective des canaux aux ions sodium et potassium avec un temps d'ouverture augmenté variant entre 0,5ms et 2,5ms. Cette entrée de charge positive en plus grande quantité et pendant un temps plus important provoque une contraction permanente des muscles du nématode appelée également hypercontraction. Le nématode ainsi paralysé est incapable d'effectuer le moindre mouvement (pour revue (Martin, 1997, Martin *et al.*, 1997)). Ce mode d'action a été confirmé par la suite sur le nématode modèle *C. elegans* (Lewis *et al.*, 1980b) et sur *H. contortus* (Sangster *et al.*, 1991).

III.5.3) Mécanismes de résistance aux agonistes cholinergiques

Le premier rapport de résistance aux agonistes cholinergiques chez les strongles digestifs date de 1979 (Sangster *et al.*, 1979). Les premières études mécanistiques de la résistance au lévamisole ont été réalisées chez l'espèce modèle *C. elegans*. En effet, des études de criblage de mutants résistants au lévamisole ont identifié 11 gènes impliqués dans le phénotype de résistance (Lewis *et al.*, 1980a, Lewis *et al.*, 1987a). Ces gènes sont impliqués directement dans la composition du récepteur et sa formation, mais également dans son fonctionnement, sa régulation et sa bonne localisation au niveau de la jonction neuromusculaire.

Chez les nématodes parasites, les mécanismes de résistance au lévamisole et au pyrantel ont été étudiés principalement au niveau électrophysiologique et pharmacologique. Le but de ces études est de caractériser les récepteurs sensibles au lévamisole des nématodes parasites afin de comprendre les mécanismes associés au phénotype de résistance retrouvé chez certains individus.

Chez le nématode parasite du porc *Oesophagostomum dentatum*, plusieurs sous-types d'AChRs avec des propriétés pharmacologiques différentes ont été identifiés. Quatre récepteurs ont été découverts et nommés dans un premier temps G25, G35, G40 et G45 en fonction de leur conductance (Robertson *et al.*, 1999). Chez *A. suum* trois récepteurs ont été caractérisés : le sous-type N (sensible à la nicotine) et le sous-type L (sensible au lévamisole

et au pyrantel) et le sous-type B (sensible au béphénium) correspondant respectivement aux récepteurs G25, G35 et G45 (Robertson *et al.*, 2002, Trailovic *et al.*, 2005). Chez les isolats d'*O. dentatum* résistants au lévamisole testés, un de ces sous-types de AChR est manquant (Robertson *et al.*, 1999). L'étude de la résistance au pyrantel chez *O. dentatum*, révèle que les isolats résistants présentent une diminution de deux de ces sous-types mais pas d'absence comme dans le cas du lévamisole (Robertson *et al.*, 2000). Chez les strongles digestifs la résistance semble être associée avec une réduction de l'affinité du lévamisole pour sa cible ou à une diminution du nombre de L-AChRs présents à la surface des cellules (Sangster *et al.*, 1988, Sangster *et al.*, 1998). Chez *H. contortus*, une perte d'affinité de la molécule anthelminthique pour sa cible a également été observée (Sangster *et al.*, 1998).

Chez le nématode du chien *Ancylostoma caninum*, des expériences de PCR quantitative ont mis en évidence la baisse significative de l'expression de trois gènes codant pour des sous-unités potentielles du L-AChR : *Aca-unc-29*, *Aca-unc-38* et *Aca-unc-63* chez un isolat très résistant par rapport à un isolat faiblement résistant (Kopp *et al.*, 2009).

En ce qui concerne la composition des L-AChRs de différentes espèces parasites, très peu de sous-unités ont été identifiées et à l'heure actuelle, seul un récepteur sensible au lévamisole a été reconstitué *in vitro* chez le nématode parasite *Ascaris suum* (Williamson *et al.*, 2009).

IV) Les récepteurs à l'acétylcholine

Les récepteurs à l'acétylcholine sont la cible de nombreux composés anthelminthiques dont le lévamisole. Ces récepteurs ont une structure très conservée entre organismes. Après une introduction rappelant l'historique de la découverte et de l'étude de ces récepteurs, nous parlerons de la structure générale de ces récepteurs et des sous-unités qui le composent ainsi que des connaissances actuelles de ces récepteurs chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*.

IV.1) Historique

En 1844, Claude Bernard découvre que le curare à la propriété de paralyser des lapins sans les tuer. Au début du XX^{ème} siècle, Langley réalise des études sur les muscles de grenouille et montre que l'ajout de nicotine provoque une contraction du muscle et que le curare bloque cet effet (Langley, 1907). De ces expériences Langley établit l'hypothèse de l'existence de récepteur « transmetteur ». Plus tard, Dale identifie l'acétylcholine comme neurotransmetteur naturel et distingue deux familles de récepteurs cholinergique (AChR) : le récepteur muscarinique de type métabotrope et le récepteur nicotinique de type ionotrope (pour revue (Bennett, 2000)). Dans les années 1930-40, l'étude des récepteurs cholinergiques prend un essor avec la découverte du poisson torpille (*Torpedo spp.*) qui possède un organe électrique composé d'un nombre important de ces récepteurs (environ 40% des protéines de cet organe).

Avec la découverte de l' α -bungarotoxine, issue de venin de serpent, dans les années 70, l'étude de ces récepteurs au niveau biochimique prend un nouvel essor (Changeux *et al.*, 1970). Cette toxine possède une très haute affinité et sélectivité pour les AChRs et se fixe de manière covalente inhibant leur activité et provoquant des paralysies (Fertuck & Salpeter, 1974, Barnard *et al.*, 1977). Avec l'utilisation de colonnes présentant une affinité pour l' α -bungarotoxine, il a été possible de purifier les protéines membranaires post synaptique et d'en étudier la fonctionnalité (Cohen *et al.*, 1972). Dans les années suivantes l'analyse moléculaire des AChRs débute par le clonage des premières sous-unités de ces récepteurs (Noda *et al.*, 1982, Noda *et al.*, 1983), puis l'expression des sous-unités d'AChR recombinantes en bactéries (*Escherichia coli*) ou levures (*Saccharomyces cerevisiae*) (Fujita *et al.*, 1986,

Tableau V : Récepteurs canaux à boucle cystéine. La première sous unité clonée de chaque récepteur est indiquée en référence.

Récepteur	Ligand	Perméabilité	Organisme	Référence
nAChR	Acétylcholine	Cationique	Verbébrés ; invertébrés	(Noda <i>et al.</i> , 1982)
GABAR	GABA	Anionique	Verbébrés ; invertébrés	(Schofield <i>et al.</i> , 1987)
EXP-1	GABA	Cationique	Invertébrés	(Beg & Jorgensen, 2003)
GlyR	Glycine	Anionique	Verbébrés ; invertébrés	(Grenningloh <i>et al.</i> , 1987)
5-HT ₃ R	Sérotonine	Cationique	Verbébrés ; invertébrés	(Maricq <i>et al.</i> , 1991)
MOD-1	Sérotonine	Anionique	Invertébrés	(Ranganathan <i>et al.</i> , 2000)
ZAC	Zn ²⁺	Cationique	Verbébrés	(Davies <i>et al.</i> , 2003)
GluCl	Glutamate	Anionique	Invertébrés	(Cully <i>et al.</i> , 1994)
HisCl-1	Histamine	Anionique	Invertébrés	(Gisselmann <i>et al.</i> , 2002)

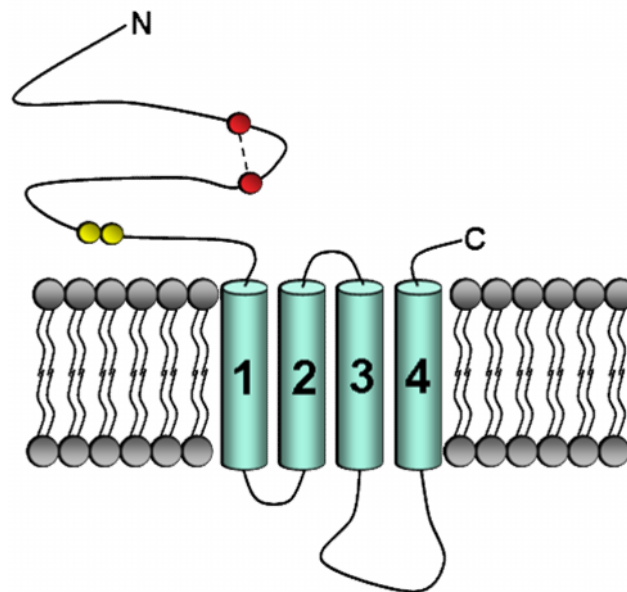


Figure 13 : Structure générale d'une sous unité d'un récepteur à l'acétylcholine. Les deux cystéines présentes chez les sous unités des récepteurs à « cys loop » sont identifiées en rouge et le pont disulfure associé en pointillé. Les deux cystéines vicinales spécifiques des sous unités sont représentées en jaune.

Gershoni, 1987) et enfin l'expression d'un récepteur fonctionnel en système hétérologue (cellules COS et œuf de *Xenopus laevis*) (Mishina *et al.*, 1984).

IV.2) Présentation générale

IV.2.1) Les récepteurs canaux activés par des ligands

Les AChRs font partis de la superfamille des récepteurs canaux ioniques activés par des ligands (Ligand-Gated Ion Channels, LGIC) et à la famille des récepteurs canaux à boucle cystéine (Sine & Engel, 2006). Cette famille regroupe des récepteurs avec des propriétés différentes qui fixent des ligands différents de type anionique ou cationique (Tableau V).

IV.2.2) Structure générale des récepteurs à l'acétylcholine

Les AChRs sont des récepteurs membranaires avec en leur centre un canal cationique. Ils jouent un rôle dans la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses, des neurones et des muscles (Changeux & Edelstein, 2005). Ces récepteurs sont des pentamères c'est-à-dire qu'ils sont composés de 5 sous-unités qui peuvent être identiques (homopentamère) ou différentes (hétéropentamère). La composition du récepteur en fonction de ses sous-unités constitue des sous-types d'AChRs qui possèdent des propriétés pharmacologiques différentes.

IV.2.2.a) Structure d'une sous-unité des récepteurs à l'acétylcholine

Une sous-unité d'AChR est une protéine avec une structure très conservée. C'est une protéine de 500 à 800 acides aminés dont le poids moléculaire est compris entre 50 kDa et 90 kDa. Cette protéine comporte un peptide signal de sécrétion qui lui permet d'être correctement adressée au sein de la cellule. Elle comporte également quatre régions hydrophobes qui sont des domaines transmembranaires (TM1-4) et qui permettent à la protéine d'être enchâssée dans la membrane plasmique de la cellule. Une grande région extracellulaire (contenant la boucle à cystéine) interagit avec le milieu extérieur et participe notamment à la fixation du ligand. Enfin elle est constituée d'une boucle intracellulaire entre le TM3 et le TM4 qui participe à la régulation du récepteur par des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation (Hopfield *et al.*, 1988). Chaque sous-unité possède également dans sa partie N-terminale une boucle de treize acides aminés entre 2 résidus cystéine qui forment un pont disulfure (cys-loop) (Karlin, 2002). Chez les sous-unités dites α , il existe également deux cystéines consécutives nommées vicinales (Kao & Karlin, 1986). La structure générale d'une sous-unité d'un AChR est présentée en figure 13.

Tableau VI : Différentes classes de sous-unités de récepteur à l'acétylcholine des organismes modèles. La première sous-unité clonée de chaque organisme est indiquée en référence.

Organisme	Classe de sous-unités	Nombre total de sous-unités	Références
Vertébrés <i>Torpedo</i> spp.	1-10, 1-4, , ,	17	(Noda <i>et al.</i> , 1982, Sumikawa <i>et al.</i> , 1982)
Insecte <i>D. melanogaster</i>	D1-D7, D1-D3	10	(Hermans-Borgmeyer <i>et al.</i> , 1986)
Nématode <i>C. elegans</i>	22 et 7 non-	29	(Squire <i>et al.</i> , 1995)

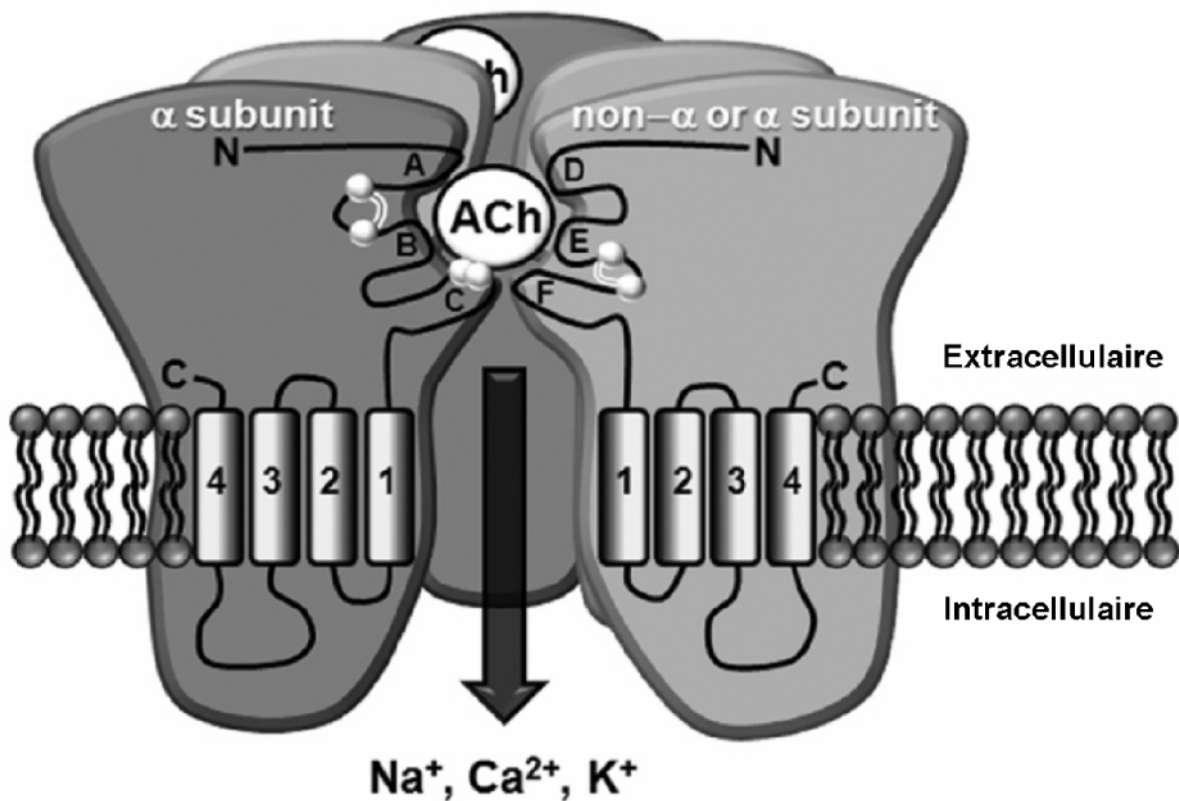


Figure 14 : Structure générale d'un récepteur à l'acétylcholine (d'après (Jones & Sattelle, 2010)). L'acétylcholine (ACh) se fixe entre une sous-unité α et une non- α pour provoquer l'entrée de cations dans la cellule.

Il existe plusieurs types de sous-unités d'AChR en fonction de l'organisme étudié. Les organismes chez lesquels ces récepteurs et donc les sous-unités qui les composent sont les plus connues sont les vertébrés (Homme, souris, poisson torpille), les insectes particulièrement la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et chez le nématode modèle *C. elegans*. Chez les vertébrés il existe 17 sous-unités différentes réparties en 5 classes : α , β , γ , δ et ϵ (Millar & Gotti, 2009). Chez la drosophile 10 sous-unités ont été identifiées et divisées en deux classes : α et β (Millar & Denholm, 2007). Le nématode *C. elegans* possède le plus grand nombre de sous-unités différentes identifiées chez un organisme modèle avec 29 sous-unités classées en 2 groupes : α et non- α (Jones *et al.*, 2007) (Tableau VI).

IV.2.2.b) Structure des récepteurs à l'acétylcholine

La structure conformationnelle des AChRs est étudiée à l'heure actuelle par des techniques de microscopie électronique qui a permis de les observer avec une résolution de 4 Å (Unwin, 2005). Cette étude a permis de confirmer la structure pentamérique des AChRs (Figure 14). La composition en sous-unités du AChR détermine ses propriétés fonctionnelles et pharmacologiques. Les cinq sous-unités s'assemblent et forment en leur centre un canal ionique perméable aux cations tel que K^+ , Na^+ et Ca^{2+} . Il existe une forte homologie entre les sous-unités au sein d'une même espèce et entre espèces (88% de similarité au niveau protéique entre la sous-unité α 4 de l'Homme et celle du rat). Les hétéropentamères possèdent au minimum deux sous-unités α . Le site de liaison à l'acétylcholine (ligand naturel de ce récepteur) ou site agoniste se trouve dans la partie N-terminale à l'interface entre une sous-unité α et une sous-unité complémentaire (β , γ , δ , ϵ , D ou non- α suivant l'espèce).

IV.2.3) Fonctionnement des récepteurs à l'acétylcholine

Les AChRs sont des récepteurs canaux retrouvés au niveau de la jonction cellulaire, et plus précisément dans les synapses cholinergiques. Ils permettent la transmission de l'influx nerveux entre deux cellules excitables. L'arrivée d'un potentiel d'action sur la cellule provoque une dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux calciques qui provoque la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique. La liaison de l'acétylcholine sur le AChR provoque l'ouverture du canal ionique et l'entrée de Na^+ dans la cellule, ce qui provoque la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx nerveux. Il y a environ 10^6 à 10^7 ions qui traversent le canal à chaque seconde (Changeux *et al.*, 1984). Les molécules d'acétylcholine sont hydrolysées par l'acétylcholinestérase (AChE) en choline et acétate. La choline est transportée dans la pré-synapse où elle est retransformée en

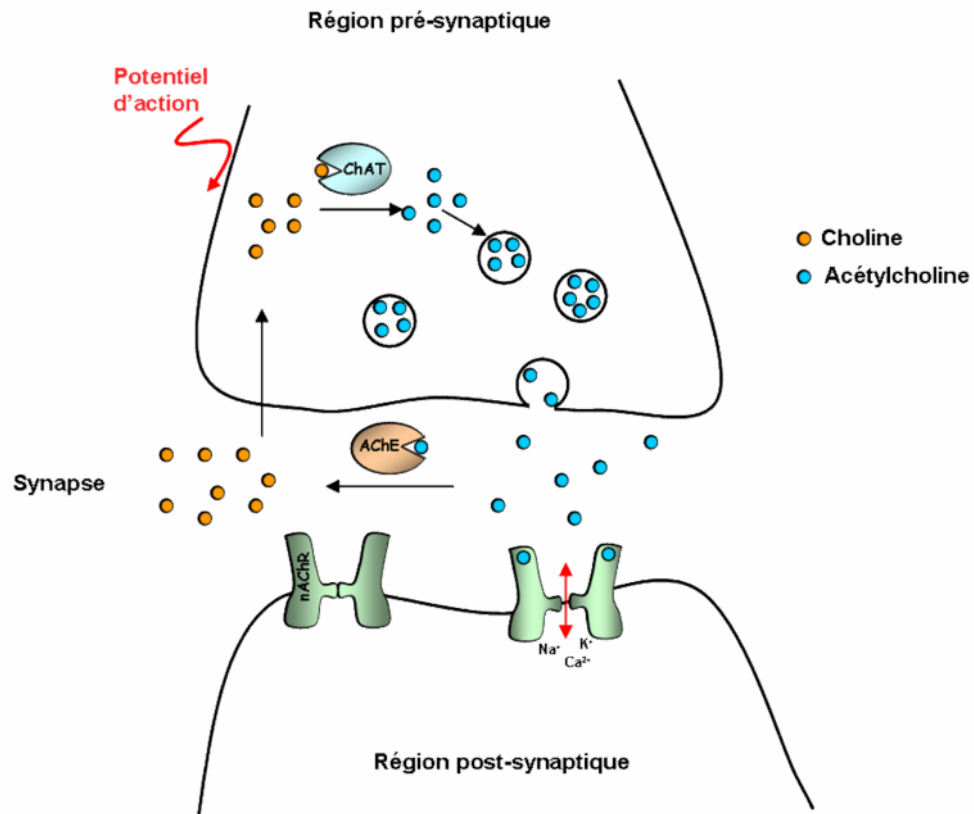


Figure 15 : Fonctionnement d'une synapse cholinergique. Lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, l'acétylcholine est relâchée dans la fente synaptique où elle se fixe sur les récepteurs à l'acétylcholine. Elle est dégradée en choline par l'acétylcholine estérase (AChE) et retourne dans la région présynaptique où elle est transformée en acétylcholine par la choline acétyltransférase (ChAT).

acétylcholine par la choline acétyltransférase (ChAT) (Figure 15). Au cours de cette transmission d'influx nerveux, les AChRs existent sous plusieurs conformations : un état de repos (R) où le récepteur est inactif, un état actif (A) où le canal ionique est ouvert, un état intermédiaire (I) lorsqu'il passe de l'un à l'autre et enfin un état dit désensibilisé (D) c'est-à-dire que l'agoniste ACh n'a plus d'effet sur le récepteur. Seul l'état actif permet le passage des ions, les trois autres sont dit inactifs ou insensibles.

IV.2.4) Maladies, addictions et cibles pharmaceutiques des récepteurs à l'acétylcholine

Les AChRs ont un rôle important dans l'organisme et leur implication dans de nombreuses pathologies a été très étudiée chez l'Homme (Kalamida *et al.*, 2007). En effet, un lien a été montré entre le fonctionnement des AChRs et certaines maladies comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, la schizophrénie, l'autisme, l'épilepsie ou encore l'hyperactivité. Toutes ces pathologies sont liées à un dysfonctionnement de ces récepteurs ou à une quantité de récepteurs présents anormale (Albuquerque *et al.*, 2009). Ils peuvent être également associés à des phénomènes d'addiction notamment à la nicotine et à l'alcool.

Les AChRs sont des récepteurs canaux qui ont la propriété de fixer des ligands ou agonistes, cette propriété leur donne un rôle de cible pharmacologique et pharmaceutique. Certains traitements contre la douleur (analgésiques), contre la mort cellulaire (neuroprotection) ou contre l'addiction à l'alcool et la nicotine ciblent ce type de récepteurs (Cleo *et al.*, 2009).

Les AChRs possèdent de nombreux sous-types (en relation avec leur composition en sous-unités) qui ont des propriétés pharmacologiques différentes c'est-à-dire qu'ils ont plus ou moins d'affinité pour des ligands spécifiques. La divergence dans le règne Animal au cours de l'évolution a fait apparaître des sous-types d'AChR spécifiques de certains phylums. Ces différences pharmacologiques ont été exploitées afin de trouver des molécules spécifiques de certaines espèces d'animaux. Ainsi de nombreuses molécules insecticides (imidaclopride, thiamethoxam, etc.) et antiparasitaires (lévamisole, pyrantel, monepantel, etc.) sont des agonistes d'AChR qui provoquent une ouverture du canal ionique plus longue et aboutit à la paralysie et / ou la mort de l'animal.

IV.2.5) Récepteur à l'acétylcholine et épissage alternatif

➤ Certains événements d'épissage alternatif permettent de générer de la variabilité au sein des sous-unités d'AChR. En effet, chez le moustique *Anopheles gambiae* le gène *Agam 9* peut coder deux isoformes protéiques. La nature des isoformes obtenues est surprenante car il s'agit d'une sous-unité α pour la première et β pour la seconde (Jones *et al.*, 2009).

➤ Les phénomènes d'épissages alternatifs permettent de modifier les caractéristiques de la sous-unité et donc du récepteur. La sous-unité γ des vertébrés a la capacité de s'assembler en homopentamère (Seguela *et al.*, 1993). Chez le rat, des études ont montré qu'il existe deux isoformes de cette sous-unité exprimées dans différents tissus de l'animal. L'isoforme 2 provient d'un ARNm qui a subi un événement d'épissage alternatif de type cassette exon c'est-à-dire qu'un nouvel exon de 87 paires de bases est incorporé dans l'ARNm sans décalage du cadre de lecture. Les propriétés pharmacologiques et physicochimiques obtenues sont sensiblement différentes du récepteur γ classique avec une affinité augmentée pour l' α -bungarotoxine et l'acétylcholine (Severance *et al.*, 2004). Chez la drosophile, il a été montré que la sous-unité D δ possède deux exons δ alternatifs (δ et δ'). Ces 2 exons comportent les résidus cystéine formant la « cys-loop » qui joue un rôle dans l'assemblage du récepteur (Green & Wanamaker, 1997). Cette étude a montré que l'isoforme protéique avec l'exon alternatif δ' s'incorpore moins bien que l'isoforme avec l'exon δ (Lansdell & Millar, 2000). La sous-unité ϵ subit elle aussi de l'épissage alternatif avec deux exons ϵ alternatifs. Cet épissage donne lieu à une modification du domaine transmembranaire 2 ce qui a une influence sur le récepteur final (Grauso *et al.*, 2002, Jin *et al.*, 2007) (pour revue (Sattelle *et al.*, 2005)). Chez le papillon *Bombyx mori*, la sous-unité ζ subit un épissage alternatif avec deux exons ζ qui introduit des variations entre les domaines transmembranaires 2 et 3 (Shao *et al.*, 2007).

➤ Dans certains cas, la modification de la sous-unité est telle que le récepteur obtenu est non fonctionnel ou sérieusement modifié. Chez la souris, un ARNm épissé de la sous-unité η donne une protéine tronquée après le domaine transmembranaire 3. Cette isoforme faiblement exprimée dans le cerveau de la souris joue un rôle de dominant négatif lorsque celle-ci est exprimée en même temps que la sous-unité η pleine longueur *in vitro* (Saragoza *et al.*, 2003). Cette forme tronquée s'incorpore au récepteur qui devient non fonctionnel. Chez l'abeille *Apis mellifera*, la sous-unité θ subit des modifications dans sa boucle intracellulaire qui possède 2 sites de phosphorylation supplémentaires (Jones *et al.*, 2006). Les sites de

Tableau VII : Détail des sous-unités identifiées chez *C. elegans*. Le ou les récepteurs associés ont été ajoutés lorsque ceux-ci ont été caractérisés. Les références citées correspondent à la description de la sous unités ou à sa caractérisation dans un récepteur.

Groupe	Sous-unité	Type	Récepteur	Références
UNC-38	UNC-38		L-AChR, ACR-2R	(Fleming <i>et al.</i> , 1997, Jospin <i>et al.</i> , 2009)
	ACR-6		-	(Mongan <i>et al.</i> , 1998)
	UNC-63		L-AChR, ACR-2R	(Culetto <i>et al.</i> , 2004, Jospin <i>et al.</i> , 2009)
ACR-16	ACR-14	non-	-	(Mongan <i>et al.</i> , 1998)
	ACR-7, ACR-10, ACR-11, ACR-15		-	(Mongan <i>et al.</i> , 1998)
	EAT-2	non-	EAT-2R	(McKay <i>et al.</i> , 2004)
	ACR-19, ACR-21		-	(Mongan <i>et al.</i> , 2002)
	ACR-16		ACR-16R (=N-AChR)	(Ballivet <i>et al.</i> , 1996)
	ACR-9	non-	-	(Mongan <i>et al.</i> , 1998)
	ACR-25		-	(Jones <i>et al.</i> , 2007)
UNC-29	ACR-2	non-	ACR-2R	(Squire <i>et al.</i> , 1995, Jospin <i>et al.</i> , 2009)
	ACR-3	non-	ACR-2R	(Baylis <i>et al.</i> , 1997, Jospin <i>et al.</i> , 2009)
	LEV-1 (ACR-1)	non-	L-AChR	(Fleming <i>et al.</i> , 1997)
	UNC-29	non-	L-AChR	(Fleming <i>et al.</i> , 1997)
DEG-3	ACR-5		-	(Winnier <i>et al.</i> , 1999)
	DES-2 (ACR-4)		DEG-3/DES-2R	(Treinin <i>et al.</i> , 1998)
	ACR-17, ACR-18, ACR-20		-	(Mongan <i>et al.</i> , 2002)
	ACR-23		MPTL-R(?)	(Mongan <i>et al.</i> , 2002, Kaminsky <i>et al.</i> , 2008)
	ACR-24		-	(Jones <i>et al.</i> , 2007)
	DEG-3		DEG-3/DES-2R	(Treinin <i>et al.</i> , 1998)
ACR-8	ACR-8		L-AChR (?)	(Gottschalk <i>et al.</i> , 2005)
	ACR-12		ACR-2R, L-AChR (?)	(Gottschalk <i>et al.</i> , 2005, Jospin <i>et al.</i> , 2009)
	LEV-8 (ACR-13)		L-AChR	(Towers <i>et al.</i> , 2005)

phosphorylation participent à la régulation et l'agrégation du récepteur, il est envisageable que l'incorporation de cet isoforme dans le récepteur altère son fonctionnement.

IV.3) Les récepteurs à l'acétylcholine du nématode *Caenorhabditis elegans*

L'étude du système nerveux et par conséquent des AChRs chez le nématode libre *C. elegans*, permet de travailler sur un modèle avec un système nerveux simple et dont chaque cellule est identifiée et localisée précisément dans l'animal. De plus, la résistance à certains nématocides tels que le lévamisole provoque un phénotype invalidant mais non léthal pour ce ver qui peut continuer à se nourrir et se reproduire sans avoir recours à la locomotion. Enfin, *C. elegans* possède deux fois plus de sous-unités d'AChR que les vertébrés et trois fois plus que les insectes. Cette diversité de sous-unités ainsi que leur possibilité d'assemblage en sous-type de récepteurs en font un modèle d'étude intéressant (Gally & Bessereau, 2003).

IV.3.1) Les récepteurs à l'acétylcholine identifiés

Chez *C. elegans*, 29 sous-unités ont été identifiées (Tableau VII), elles ont été classées en cinq groupes : les groupes UNC-29, ACR-8, UNC-38, ACR-16 et DEG-3 (Mongan *et al.*, 1998, Jones & Sattelle, 2004). Ces cinq groupes sont composés de 3 à 11 sous-unités en fonction de leur proximité génétique, ils peuvent être composés de sous-unités , non- ou des deux types. Elles sont nommées pour la majorité par *acr* pour « AcetylCholine Receptor » de 1 à 25 sans *acr-22* qui à été reclassé plus tard dans une autre famille de sous-unité. Certaines ont un nom associé à un phénotype : *unc* (UNCoordinated), *des* (DEgeneration Suppressor), *deg* (DEGeneration of certain neurons), *lev* (LEVamisole resistant) et *eat* (EATing : abnormal pharyngal pumping). L'association en récepteur de la majorité de ces sous-unités n'est pour l'heure pas connue et très peu de récepteurs ont été caractérisés à ce jour. Seul cinq récepteurs ont été identifiés au niveau de leur composition en sous-unités et au niveau pharmacologique.

➤ En 1998, Treinin *et al* reconstitue le récepteur DEG-3/DES-2 (DEG-3/DES-2R) de *C. elegans*. Ce récepteur est composé de sous-unités issues de deux gènes : *des-2* et *deg-3* organisés en opéron. Ces deux sous-unités d'AChR s'assemblent en pentamère pour former un récepteur ionotrope fonctionnel. En complément des deux sous-unités, l'assemblage de ce récepteur nécessite la présence d'une protéine accessoire : RIC-3 (Resistance to Inhibitors of Cholinesterase 3 homolog) (Halevi *et al.*, 2002). Cette protéine transmembranaire chaperonne

agit sur le repliement conformationnel du récepteur au niveau du réticulum endoplasmique (Millar, 2008). Le récepteur DEG3/DES2 est présent dans les neurones au niveau de la queue et de la tête du nématode, il possède la propriété pharmacologique d'avoir plus d'affinité pour la choline que pour l'acétylcholine (Yassin *et al.*, 2001).

➤ Certains AChRs sont composés de cinq sous-unités identiques. C'est le cas du récepteur ACR-16 (ACR-16R ou N-AChR) qui a été caractérisé chez *C. elegans*. La sous-unité ACR-16 possède 61% de similarité avec la sous-unité 7 des vertébrés qui elle aussi possède la capacité de s'assembler en homopentamère. Le N-AChR est sensible à l'acétylcholine et à la nicotine et insensible à de nombreux agonistes tels que le bungarotoxine (Ballivet *et al.*, 1996). Des tests d'affinité réalisés avec différentes molécules anthelminthiques ont montré que N-AChR est insensible au lévamisole, aux tétrahydropyrimidines (pyrantel, oxantel, morantel) et à l'ivermectine (Raymond *et al.*, 2000). Ce récepteur nécessite également comme le DEG-3/DES-2R la présence de la protéine chaperonne RIC-3 pour sa maturation (Cohen Ben-Ami *et al.*, 2009). Des études tendent à démontrer que le N-AChR est complémentaire d'un autre sous-type de récepteur nicotinique à l'acétylcholine : le L-AChR. En effet ces deux récepteurs sont retrouvés aux mêmes endroits au niveau du nématode : les cellules musculaires. De plus l'altération d'un de ces deux récepteurs provoque un phénotype de locomotion altéré alors que le dysfonctionnement des deux provoque une paralysie totale du nématode (Touroutine *et al.*, 2005).

➤ Le récepteur EAT-2 est localisé dans la partie antérieure de *C. elegans* et à été associé à un phénotype de défaut de fonctionnement du pharynx. A l'heure actuelle, seule la sous-unité EAT-2 est connue dans ce récepteur qui est mal connu au niveau de sa composition en sous-unités et de ses caractéristiques pharmacologiques. Ce récepteur est localisé au niveau du pharynx et il interagit avec une petite protéine de 71 acide aminés, EAT-18, de fonction inconnue (McKay *et al.*, 2004).

➤ Le récepteur ACR-2 (ACR-2R) est impliqué dans la balance entre la contraction et le relâchement musculaire permettant ainsi au nématode de se déplacer. Ce récepteur est constitué de trois sous-unités (UNC-38, UNC-63 et ACR-12) et de deux sous-unités non- (ACR-2 et ACR-3). Ce récepteur a été reconstitué en œufs de xénope et est sensible à l'acétylcholine, faiblement sensible à la nicotine et insensible à des composés comme le lévamisole ou la choline (Jospin *et al.*, 2009).

Tableau VIII : Détail des gènes identifiés chez les mutants résistants au lévamisole de *C. elegans*. D'après (Lewis *et al.*, 1980b, Jones *et al.*, 2005)

Phénotype	Gène	Protéine	Référence
Extrêmement résistant "uncoordinated"	<i>lev-1</i>	sous unité non- de nAChR	(Fleming <i>et al.</i> , 1997)
	<i>unc-29</i>	sous unité non- de nAChR	(Fleming <i>et al.</i> , 1997)
	<i>unc-38</i>	sous unité de nAChR	(Fleming <i>et al.</i> , 1997)
	<i>unc-63</i>	sous unité de nAChR	(Culetto <i>et al.</i> , 2004)
	<i>unc-74</i>	thiorédoxine	(Lewis <i>et al.</i> , 1987a)
	<i>unc-50</i>	protéine transmembranaire golgienne	(Eimer <i>et al.</i> , 2007)
Partiellement résistant "pseudo wild type"	<i>lev-8</i>	sous unité de nAChR	(Towers <i>et al.</i> , 2005)
	<i>lev-9</i>	protéine extracellulaire	(Gendrel <i>et al.</i> , 2009)
	<i>lev-10</i>	protéine transmembranaire	(Gally <i>et al.</i> , 2004)
Partiellement résistant "Twitcher"	<i>unc-22</i>	protéine myofilaementaire	(Benian <i>et al.</i> , 1993)
	<i>lev-11</i>	tropomyosine	(Kagawa <i>et al.</i> , 1997)
"Uncoordinated" anormal	<i>unc-68</i>	récepteur à la ryanodine	(Maryon <i>et al.</i> , 1996)

IV.3.2) Le récepteur au lévamisole

Le lévamisole est un composé qui mime l'action de l'acétylcholine. En 1975, le mode d'action du lévamisole est élucidé. Ce composé agit sur les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine situés au niveau des cellules musculaires du nématode (Coles *et al.*, 1975). Dans les années 1980 Lewis *et al.* découvrent que des mutants du nématode *C. elegans* résistants au lévamisole ont un déficit en AChRs et plus précisément au niveau de la jonction neuromusculaire (Lewis *et al.*, 1980a, Lewis *et al.*, 1980b).

➤ Afin de découvrir quels gènes sont impliqués dans le récepteur au lévamisole (L-AChR) chez *C. elegans*, des études ont été effectuées sur des mutants résistants au lévamisole avec un phénotype de résistance extrême ou partiel. Ces expériences ont permis d'identifier quels gènes étaient inactivés chez les isolats résistants. Dans ce premier crible, douze gènes impliqués dans la résistance au lévamisole ont été identifiés (Lewis *et al.*, 1987a, Lewis *et al.*, 1987b) (Tableau VIII).

Cinq de ces gènes codent des sous-unités d'AChR, deux sont des sous-unités non- : *lev-1* et *unc-29*, et trois sont des sous-unités : *unc-38*, *unc-63* et *lev-8*. Le L-AChR est donc composé de cinq sous-unités différentes avec des rôles plus ou moins importants puisque les sous-unités *unc-29*, *unc-63* et *unc-38* sont considérées comme essentielles au récepteur alors que *lev-1* et *lev-8* ne le sont pas (Qian *et al.*, 2008). Ce dernier résultat implique que le lévamisole pourrait se fixer sur plusieurs sous-types de récepteurs avec une affinité plus ou moins importante et des effets sur ces récepteurs sensiblement différents.

D'autres gènes étudiés sont indirectement responsables de la résistance au lévamisole chez ces mutants, ce sont en général des gènes qui ont un rôle dans la locomotion du nématode. C'est le cas des protéines UNC-22 et LEV-11 qui interviennent directement dans la contraction musculaire du nématode (Benian *et al.*, 1993, Kagawa *et al.*, 1997). UNC-68, joue un rôle dans l'homéostasie du Ca^{2+} intracellulaire, ce récepteur est présent à la surface du réticulum sarcoplasmique (compartiment cellulaire contenant des ions Ca^{2+}). Il sert lors d'une contraction à augmenter la concentration de calcium intracellulaire et ainsi d'augmenter l'effet de contraction. En effet lorsque le L-AChR est activé une entrée de cations s'effectue dans la cellule (Ca^{2+} et Na^+), les ions calcium se fixent sur le récepteur à la ryanodine ce qui libère des ions Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme et amplifie la contraction (Puttachary *et al.*, 2010, Robertson *et al.*, 2010).

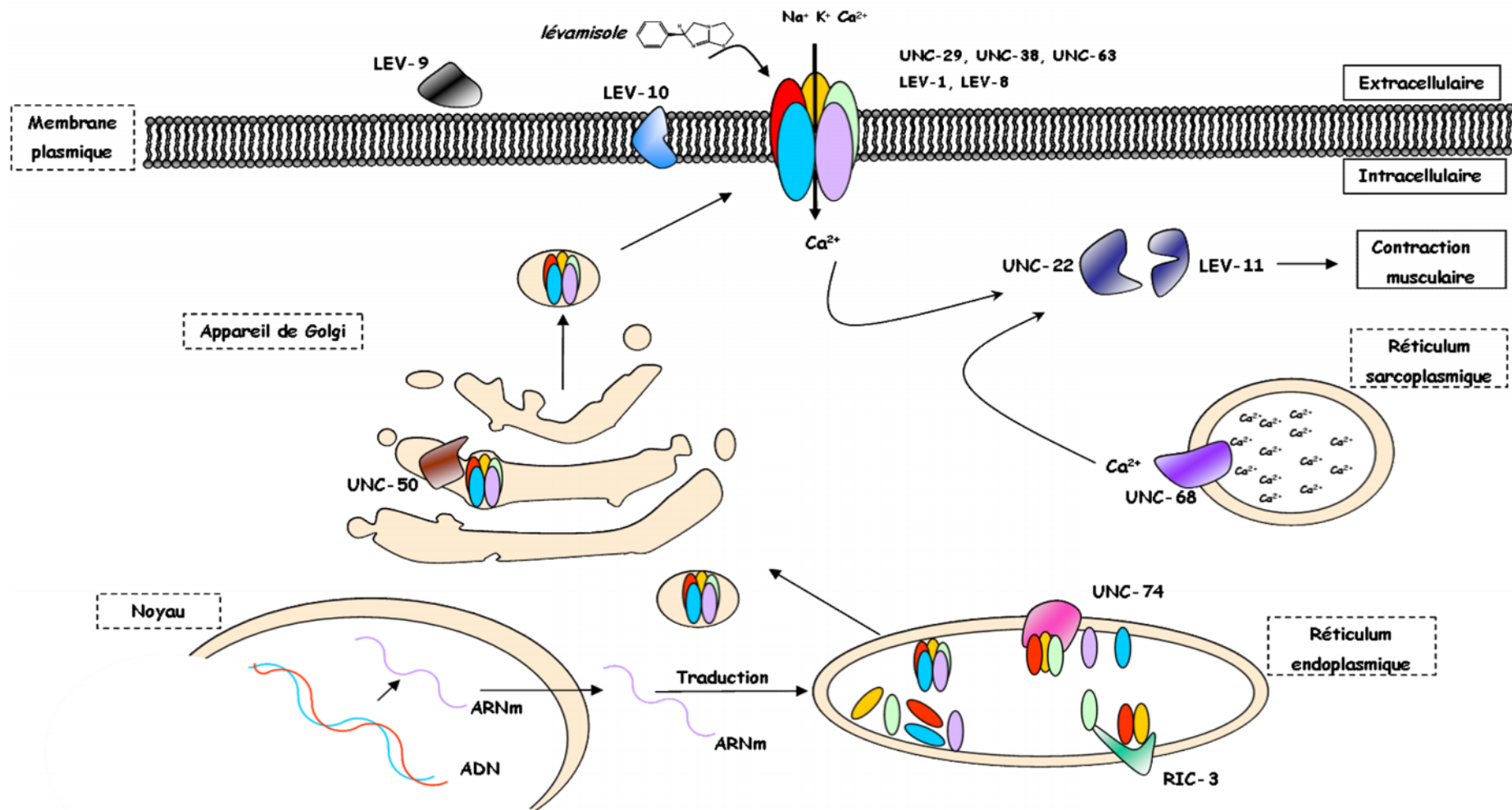


Figure 16 : Représentation schématique des différentes protéines interagissant avec le récepteur au lévamisole

Les quatre autres gènes codent des protéines accessoires c'est-à-dire des protéines qui participent à la mise en place et au bon fonctionnement du récepteur. Ainsi les gènes *lev-9* et *lev-10* codent des protéines qui jouent un rôle dans l'agrégation du récepteur au niveau de la jonction neuromusculaire (Gally *et al.*, 2004, Gendrel *et al.*, 2009). La protéine UNC-50 est une protéine transmembranaire localisée dans l'appareil de golgi qui joue un rôle dans la régulation du transport du L-AChR à l'intérieur de la cellule (Eimer *et al.*, 2007). UNC-74 est une thiorédoxine proche de la protéine humaine TMX3 (Haugstetter *et al.*, 2005). Cette protéine semble être localisée dans le réticulum endoplasmique et participe au repliement conformationnel des sous-unités du récepteur.

Ainsi le gène *ric-3*, a été découvert lors de l'étude de la résistance aux inhibiteurs de la cholinestérase (Nguyen *et al.*, 1995). Ce gène est essentiel à de nombreux récepteurs à l'acétylcholine (Halevi *et al.*, 2002, Halevi *et al.*, 2003). *ric-3* code une protéine transmembranaire chaperonne située dans la membrane du réticulum endoplasmique qui participe comme UNC-74 à donner aux sous-unités du L-AChR une conformation fonctionnelle. Un schéma récapitulatif des 12 protéines identifiées par Lewis *et al* est présenté figure 16.

Les récepteurs à l'acétylcholine sensibles au lévamisole des nématodes sont la cible de composés anthelminthiques comme le lévamisole. L'augmentation d'isolats résistants au lévamisole dans les élevages mondiaux de petits ruminants accroît l'intérêt de caractériser ce récepteur chez de nombreuses espèces de nématodes.

Récemment la reconstitution *in vitro* en œufs de xénope a permis de déterminer que 8 gènes sont indispensables pour reconstituer le récepteur au lévamisole en système hétérologue. Parmi ces gènes figurent les 5 sous-unités (*unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* & *lev-8*) et 3 gènes codant pour des protéines accessoires (*ric-3*, *unc-50* & *unc-74*) (Boulin *et al.*, 2008). Ce dernier résultat, offre des perspectives très prometteuses en tant qu'outil de reconstitution de récepteur de nématode *in vitro*, et va permettre de disposer d'un moyen de validation fonctionnel afin d'étudier les polymorphismes observés lors des comparaisons d'isolats sensibles ou résistants au lévamisole.

V) Objectifs de la thèse

Au début de ce travail de thèse, seules des données électrophysiologiques et pharmacologiques étaient disponibles chez les strongles digestifs montrant que la résistance au lévamisole serait due à une réduction de l'affinité du lévamisole pour sa cible et / ou une diminution du nombre de récepteurs présents à la surface des cellules. Les données moléculaires concernant les mécanismes de résistance au lévamisole chez *H. contortus* étaient inexistantes. Seuls les homologues de la sous-unité UNC-38 avaient été identifiés chez les 3 espèces de parasites étudiées au laboratoire (Wiley *et al.*, 1996, Hoekstra *et al.*, 1997b, Walker *et al.*, 2001) et aucun polymorphisme n'a été associé à un phénotype de résistance (Hoekstra *et al.*, 1997b, Wiley *et al.*, 1997).

Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux de thèse était d'étudier au niveau moléculaire le mécanisme de résistance au lévamisole chez le nématode parasite *Haemonchus contortus* dans un premier temps puis d'étendre les résultats obtenus aux deux autres espèces de strongles d'intérêts : *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*.

L'étude de la résistance au lévamisole chez les nématodes parasites au niveau moléculaire s'est effectuée selon les trois grands axes :

1) Identifier et caractériser chez les espèces d'intérêt agronomique (*H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*) des homologues des gènes du nématode modèle *Caenorhabditis elegans* codant les sous-unités du récepteur au lévamisole.

2) Identifier des gènes potentiellement impliqués dans la résistance au lévamisole chez *H. contortus* par une technique de comparaison de transcriptomes de nématodes sensibles *versus* résistants au lévamisole par une technique de cDNA-AFLP. Cette approche *sans a priori* ayant pour but de compléter les données obtenues par la stratégie gènes-candidats décrite précédemment.

3) Valider les polymorphismes observés sur certains gènes identifiés au cours de ces 2 approches à l'aide d'un outil de validation fonctionnelle : l'œuf de xénope.

RÉSULTATS

ARTICLE 1

Introduction de l'article 1

Le lévamisole est un agoniste cholinergique qui a pour cible un récepteur à l'acétylcholine. Ce composé provoque chez le nématode une paralysie due à la contraction permanente de ses muscles. Cependant, dans certains élevages des isolats de nématodes parasites deviennent résistants à cette molécule rendant le traitement inefficace. Chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*, le criblage de mutants résistants au lévamisole a permis d'identifier 11 gènes conférant la résistance à ce composé. Parmi ces gènes, 5 codent des sous-unités d'un récepteur à l'acétylcholine sensible au lévamisole (L-AChR) : 3 sous-unités (*unc-38*, *unc-63* & *lev-8*) et 2 sous-unités non- (*unc-29* & *lev-1*).

Chez le nématode parasite *Haemonchus contortus*, seul le gène *hca-1* correspondant à l'homologue d'*unc-38* a été décrit. La recherche de polymorphismes entre isolats sensibles et résistants au lévamisole sur cette sous-unité n'avait pas permis de déceler de différences associées à la résistance (Hoekstra *et al.*, 1997b). Pour les 2 autres espèces de strongles étudiées au laboratoire, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*, seules des séquences partielles codant les homologues d'UNC-38 ont été identifiées (Wiley *et al.*, 1996, Walker *et al.*, 2001).

Dans le but d'étudier la résistance chez les 3 espèces de strongles digestifs *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, nous avons cherché à cloner les homologues des sous-unités UNC-29, UNC-38, UNC-63 LEV-1 et LEV-8 identifiées chez *C. elegans*. Cette recherche a été effectuée chez des isolats des 3 espèces de strongle disponibles au laboratoire. Pour chaque espèce, 3 isolats sensibles et 2 isolats résistants au lévamisole ont été utilisés pour identifier et comparer les séquences nucléotidiques des sous-unités.

L'ensemble des résultats est présenté dans l'article suivant :

Neveu C, Charvet CL, **Fauvin A**, Cortet J, Beech RN & Cabaret J (2010). Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20, 414-425.

Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance

Cédric Neveu^a, Claude L. Charvet^a, Aymeric Fauvin^a, Jacques Cortet^a, Robin N. Beech^b and Jacques Cabaret^a

Objectives The molecular mechanisms of levamisole (LEV) activity and expression of resistance remain largely unknown in parasitic nematodes. In contrast, genetic screens for mutants that survive exposure to LEV in the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* have led to the identification of five genes (*unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* and *lev-8*) that encode a LEV-sensitive acetylcholine receptor (L-AChR). Loss of these genes leads to LEV resistance. In this study, orthologues of these genes were identified in three species of trichostrongylid nematodes that have a major impact on small ruminants: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. Polymorphism associated with LEV resistance have been investigated by comparing transcripts of these subunits in LEV susceptible and LEV-resistant isolates of the three strongylid species.

Basic methods Partial sequences were identified by PCR experiments and full-length cDNA sequences corresponding to AChR subunits in the three trichostrongylid species were obtained using 3'-rapid amplification of cDNA ends-PCR and 5' rapid amplification of cDNA ends anchored with the spliced leader sequence, SL1. Expression of L-AChR subunits was investigated in LEV-resistant and LEV-susceptible isolates of *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* using reverse transcription PCR.

Main results We have identified a total of 20 full-length cDNA sequences corresponding to L-AChR subunits in three parasitic trichostrongylid species of which 14 correspond to novel sequences. Genes orthologous to *unc-29*, *unc-63*, *unc-38* and *lev-1* were found in each trichostrongylid species, whereas no gene corresponding to *lev-8* has yet been identified. We have found 11 distinct

paralogous sequences corresponding to the *C. elegans* *unc-29* gene clustered in four groups revealing an unexpected diversity of *unc-29*-like genes. Complete coding sequences of the L-AChR subunits in two LEV-resistant and three susceptible isolates of *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* were essentially unchanged, but abbreviated transcripts of the *unc-63* subunit were specifically expressed in resistant isolates of all three species.

Conclusion The candidate gene strategy developed in this study revealed an unexpectedly high diversity of L-AChR subunits specific to the trichostrongylid parasites that are a principal target for the drug LEV. Abbreviated variants, predicted to produce nonfunctional *unc-63*, were associated with LEV resistance. This study contributes significantly to a better understanding of LEV receptor constitution in parasitic nematodes and highlights the putative role of aberrant mRNA encoding L-AChR subunits in LEV resistance. *Pharmacogenetics and Genomics* 20:414–425 © 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Pharmacogenetics and Genomics 2010, 20:414–425

Keywords: anthelmintic resistance, *Haemonchus contortus*, levamisole, levamisole sensitive acetylcholine receptor subunits, parasitic nematodes, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis*

^aFrench National Institute for Agricultural Research (INRA), Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly, France and ^bInstitute of Parasitology, McGill University, Quebec, Canada

Correspondence to Cédric Neveu, PhD, French National Institute for Agricultural Research (INRA), UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly F-37380, France
Tel: +33 247427674; fax: +33 247427774;
e-mail: cedric.neveu@tours.inra.fr

Received 14 October 2009 Accepted 13 February 2010

Introduction

Levamisole (LEV) is a cholinergic agonist widely used to control parasitic nematodes of humans, livestock and companion animals. This anthelmintic induces hypercontraction of body wall muscle, leading to spastic paralysis [1]. However, LEV efficacy has been compromised by the emergence of resistant parasites, specifically in gastrointestinal nematodes of small ruminants [2]. Indeed, the widespread use of LEV in the sheep and goat industry has

selected for resistance of trichostrongylid species, among which *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* represent the most prevalent and pathogenic [3].

The pharmacological target of LEV and other cholinergic agonists such as pyrantel and tribendimidine are acetylcholine receptors (AChRs) that mediate fast synaptic transmission at the neuro-muscular junction of nematodes

[4–7]. These receptors can be classified as responding to LEV, nicotine or buphenium and each has distinct electrophysiological properties [8].

Molecular characterization of the levamisole AChR (L-AChR) was first achieved in the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* [9]. In this model organism, forward genetic screens have been extremely productive for identifying genes that encode L-AChR subunits and other factors required for their assembly [10,11]. Molecular analysis of LEV resistant mutants has identified five AChR subunit genes in *C. elegans*: *unc-38*, *unc-63*, *lev-8*, *unc-29* and *lev-1* [12–15]. Recently, Boulin *et al.* [9] have demonstrated that the subunits encoded by these five genes associate to reconstitute a functional L-AChR when coexpressed with ancillary proteins in *Xenopus* oocytes. In the parasitic nematode *Ascaris suum* (swine worm), it has been shown that only two AChR subunits encoded by the orthologues of *unc-38* and *unc-29* genes are necessary to constitute a receptor sensitive to LEV when coexpressed in *Xenopus* oocytes [16]. Altogether these results highlight the complexity and diversity of L-AChR in nematodes and emphasize the need for further investigation of L-AChR in parasitic species.

In strongylid nematodes, LEV resistance is thought to be associated with changes in binding characteristics or in the number of L-AChR channels present [17,18]. In the nematode parasite of pigs, *Oesophogostomum dentatum* resistance to LEV has been characterized as the loss of the specific LEV receptor while the nicotine and buphenium receptors were unaffected [19]. In the strongylid parasite, *Ancylostoma caninum* (dog hookworm), genes orthologous to *unc-38*, *unc-63* and *unc-29* have reduced expression in a highly pyrantel-resistant isolate when compared with a low pyrantel-resistant isolate [6]. Unfortunately, the L-AChR subunit composition, and thus polymorphism associated with LEV-resistance remain poorly understood

in trichostrongylid species of ruminants. Earlier studies carried out on *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* mainly focused on *unc-38* orthologous genes [20–22]. However, sequence comparison of *unc-38* orthologues in LEV-susceptible versus resistant isolates failed to identify polymorphism associated with resistance in *H. contortus* and *T. circumcincta* [20,22].

In this study we report the identification of 20 full-length cDNA sequences corresponding to distinct orthologues or paralogues of *C. elegans* L-AChR subunits in *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*. In addition to an unexpected diversity, some L-AChR subunits shared striking sequence similarities that seem to be specific to trichostrongylid parasitic nematodes. The 20 L-AChR subunit transcripts were compared in LEV-susceptible (LEV-S) versus LEV-resistant (LEV-R) isolates of the three trichostrongylid species, leading to the identification of abbreviated L-AChR subunits associated with the resistance phenotype.

Materials and methods

Nematodes isolates

Nematode species, isolate names, geographic origins and LEV resistance status are presented in Table 1. For all nematode isolates used in this study, the LEV susceptibility or resistance status was evaluated during at least three successive passages in pairs of experimentally infected lambs (Ile de France), one treated with LEV (at the manufacturer recommended dose of 7.5 mg/kg of bodyweight) and the other remaining untreated. Nematode isolates were classified as LEV susceptible when no egg or adult was found in LEV treated sheep. In contrast nematode isolates were classified as LEV resistant when faecal egg counts and worm counts at necropsy were reduced less than 90% in LEV treated sheep. Worm counts during the last passage in pair of LEV treated and

Table 1 Characteristics of nematodes isolates

Nematode species	Isolate code	Geographic origin	Levamisole resistance status	Provider	Reference	Worm count at necropsy (number of adult nematodes recovered for 100 inoculated larvae)	
						Untreated sheep	Levamisole treated sheep
<i>H. contortus</i>	ISE*	Zimbabwe	Susceptible	Franck Jackson	[23]	39.82	0
	HcoBR	Brazil	Susceptible	Claudia Bevilacqua	[24]	13.63	0
	HcoZA	Zaire	Susceptible	INRA collection	[24]	33.14	0
	HcoCE	South Africa	Resistant	Jan Van Wyck	[24]	11.12	3.42
	RHS6 ^b	Zimbabwe	Resistant	Fred Borgsteede	[25]	40.12	31.32
<i>T. circumcincta</i>	TciSO	France	Susceptible	INRA collection		36.24	0
	TciCH	France	Susceptible	INRA collection		30.82	0
	TciHE	France	Susceptible	INRA collection		39.60	0
	TciNi	France	Resistant	Carine Paraud	[26]	26.70	6.04
	TciNZ	New Zealand	Resistant	William Pomroy		40.75	33.64
<i>T. colubriformis</i>	TcoSE	France	Susceptible	INRA collection		35.38	0
	TcoHE	France	Susceptible	INRA collection		42.92	0
	TcoSO	France	Susceptible	INRA collection		36.8	0
	TcoNi	France	Resistant	Carine Paraud	[26]	37.24	6.86
	TcoGA	France, Guadeloupe	Resistant	INRA collection		62.36	24.24

INRA, French National Institute for Agricultural Research.

*This isolate was chosen for the *H. contortus* mapping and sequencing project.

^bArtificially selected from the susceptible isolate SHS from Zimbabwe [25].

nontreated lambs are summarized in Table 1. Adult nematodes were collected from the abomasum (*H. contortus* and *T. circumcincta*) or the small intestine (*T. colubriformis*) of experimentally infected sheep killed at the French National Institute for Agricultural Research abattoir. All sheep studies were performed under experimental agreement 6623 provided by the Veterinary Services (Direction des Services Vétérinaires) from Indre et Loire (France).

Isolation of RNA

To optimize the identification of L-AChR subunits expressed during the adult stage of the three trichostrongylid species, RNA was isolated from adult males and not females as they contain eggs that could have potentially diluted the target mRNAs.

Total RNA was prepared from 10 adult males from each *H. contortus* isolate, or 50 adult males of *T. circumcincta* or *T. colubriformis*. Frozen worms were homogenized in Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and total RNA was isolated according to the manufacturer's recommendations. RNA pellets were dissolved in 50 µl of RNA secure resuspension solution (Ambion, Austin, Texas, USA) and were DNase treated with the TURBO DNA-free kit (Ambion). RNA concentration was measured using a nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Reverse transcription

First strand cDNA synthesis was performed on 3 µg of total RNA using the oligo (dT) RACER primer (Invitrogen) and the superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Gene cloning

Full-length AChR subunits were identified in *H. contortus* (ISE isolate), *T. circumcincta* (TeiSO isolate) and *T. colubriformis* (TeoSO isolate) using first strand cDNA as template for PCR reactions. The 3' ends of cDNAs were isolated by 3'RACE PCR using the GeneRacer kit (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The 5' end of the cDNAs were obtained by using the nematode spliced-leader sequence SL1 (ggtrtaattac ccaagtttgag) in association with reverse primers designed in partial sequences isolated during 3' RACE experiments.

Two sets of primers were used to isolate trichostrongylid AChR subunit sequences. The *C. elegans unc-38* homologous genes were cloned using primers designed on previously identified complete or partial cDNA sequences: the *H. contortus* full-length cDNA *hca-1* [20], the *T. circumcincta* partial cDNA sequence *tea-1* [22] and the *T. colubriformis* partial cDNA sequence *tar-1* [21]. cDNA sequences corresponding to homologues of the *C. elegans unc-29*, *unc-63*, *lev-1*, genes were identified using degenerate primers based on the following sequences: *Cel-unc-29*, *Cel-lev-1*, *Cel-unc-63*, *Cel-unc-38* and trichostrongylid sequences as they became available. Degenerate primer sequences are available upon request.

All PCR reactions were performed with a programmable thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany). Identification of 5' and 3' ends were carried out using two rounds of nested PCR, in a final volume of 20 µl, containing 200 ng of first-strand cDNA (or 1 µl of 1/100 dilution of amplification product from the first round of PCR), 1 U of proofreading Phusion Taq polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland), 0.25 mmol/l dNTPs each and 0.3 µmol/l of each primer. The reaction mixture was denatured by heating at 94°C for 5 min, followed by 33 cycles at 94°C for 45 s, 52–56°C (depending on specific melting temperature of primers) for 45 s, 72°C for 95 s. A final extension step was performed at 72°C for 5 min. Amplification products were cloned in PCR4Blunt-TOPO vector (Invitrogen) and sequenced by GATC biotech (Konstanz, Germany). Full-length coding cDNAs were amplified with specific primers within 5' and 3' untranslated regions (UTRs, primer sequences are reported in Table 2), using one round of PCR in similar cycling conditions as described earlier excepting that the cycle number was increased to 38. For each gene, sequence alignment of full-length coding sequence with their corresponding 5' and 3' ends allowed identification of complete cDNA sequences from SL1 to polyA tail.

Investigation of polymorphism associated with levamisole resistance

Reverse transcription-PCR experiments were carried out on first strand cDNA in the three LEV-S and the two LEV-R isolates of *H. contortus*, *T. colubriformis* and *T. circumcincta* (Table 1). PCR reactions were carried out as described earlier with specific primers designed in 5' and 3' UTRs of cDNA sequences corresponding with *unc-38*, *unc-63*, *lev-1* and *unc-29* homologous genes (Table 2). Sample normalization was assessed using β-tubulin as the reference transcript. Moreover, to investigate sequence polymorphism potentially associated with LEV-resistance, amplification products obtained in LEV-resistant and LEV-S isolates were cloned in PCR4Blunt-TOPO vector (Invitrogen). At least four clones corresponding to each AChR subunit genes in LEV-resistant and LEV-S isolates were sequenced by GATC biotech (Germany). These sequences were aligned using the MULTALIN program [27] to obtain consensus sequences corresponding to each AChR subunit cDNA from each nematode isolate.

Sequence analysis

Database searches were performed with the BLAST Network Service (National Center for Biotechnology Information), using the BLASTX algorithm [28]. Signal peptide predictions were carried out using the SignalP 3.0 server [29] and membrane-spanning regions were predicted using the TMpred program (available at http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

Phylogenetic analyses were performed on full-length cDNA sequences using the Seaview program package [30]. Multiple alignment was done using the program

Table 2 Primer sequences designed in 5' and 3' untranslated regions of cDNA sequences corresponding to *C. elegans lev-1, unc-63, unc-38* and *unc-29* homologous genes in *H. contortus* (*Hco*), *T. circumcincta* (*Tci*) and *T. colubriformis* (*Tco*)

<i>Hco-lev-1</i> F	CCGGGATGATGTCGGACGCTG	<i>Tci-lev-1</i> F	TCGGACGCTGAAGATCGTCTG	<i>Tco-lev-1</i> F	TTACCAACAGCCGCCACCATG
<i>Hco-lev-1</i> R	AAGATCCTCTCTGAAGGCACG	<i>Tci-lev-1</i> R	TGAGTGTCTTCTCTGAAGGGA	<i>Tco-lev-1</i> R	CGAAAAACITCGCAGGCAGAA
<i>Hco-unc-63</i> F	GATAGAAGTGGATGGGGCCGA	<i>Tci-unc-63</i> F	TCACCAACAGATAGAAGTGGA	<i>Tco-unc-63</i> F	GATAGAAGTGGATGGGGCCGA
<i>Hco-unc-63</i> R	TTAAACAAAGAGTGCCGACGG	<i>Tci-unc-63</i> R	GATGGATGGATGACACGACGA	<i>Tco-unc-63</i> R	CCTCTCCGATCACGTGACGAT
<i>Hco-unc-38</i> F	CTTTGCTCTGGACTTCACCAA	<i>Tci-unc-38</i> F	CTCTACAACGCTTGGCAGCTT	<i>Tco-unc-38</i> F	CGACCTGTGTAATCTGCAAA
<i>Hco-unc-38</i> R	ATAGTCGAGTGCATGGCACAT	<i>Tci-unc-38</i> R	AAATGACCATGAACTCTGTGA	<i>Tco-unc-38</i> R	CATTGCCAGTGAATTCGCTT
<i>Hco-unc-29.1</i> F	ACGTCATCGAATTCGACGATA	<i>Tci-unc-29.1</i> F	TACTGGTATGTAGCCCCATTG	<i>Tco-unc-29.1</i> F	AGCATTCCCAACCCCGTCACA
<i>Hco-unc-29.1</i> R	GACTCAACGAAGGGCTACACA	<i>Tci-unc-29.1</i> R	GAAATCACGGGAAGTGAGCGT	<i>Tco-unc-29.1</i> R	ATAGCAAGGCGCAAGTAGGT
<i>Hco-unc-29.2</i> F	TGATGTTGTTGTAAGTACTG	<i>Tci-unc-29.2</i> F	GATCAGTATGTGAAGTCGTTG	<i>Tco-unc-29.2</i> F	GATGCTTAGTCACTGCTACCA
<i>Hco-unc-29.2</i> R	TGAAGCATTGACTGACCCGT	<i>Tci-unc-29.2</i> R	TGAAAGTACTGACTGACCCGT	<i>Tco-unc-29.2</i> R	GAAGCATGATTGACCCGTAT
<i>Hco-unc-29.4</i> F	ATCGATATGCGCGCCAGCAA	<i>Tci-unc-29.4</i> F	GCATTAACATCTTAACATC	<i>Tco-unc-29.4</i> F	GTACTCGAATTCATGAAACC
<i>Hco-unc-29.4</i> R	TCATAAATGACCCGTATTGCT	<i>Tci-unc-29.4</i> R	TCAGGATTGAAAATCACGTCT	<i>Tco-unc-29.4</i> R	CAATCGATAAACCCCGTGAA
<i>Hco-unc-29.3</i> F	GTAGCAGATCCATTAAGCA	<i>Tci-unc-29.3</i> F	FGGTTGCAGAAGTGCATTGTA		
<i>Hco-unc-29.3</i> R	ATGCAAATTGAAAACCCGTCT	<i>Tci-unc-29.3</i> R	ATGTAGCCCGCTTTTCGTGA		

Muscle with standard parameters [31]. Relationships between sequences were determined using the neighbour-joining method and the HKY substitution model [32]. One thousand bootstrap replicates were performed to test the support of nodes. The resulting phylogenetic tree was generated using the FigTree program version 1.2.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Results

Cloning *unc-63, unc-38, lev-1* and *unc-29* homologues from *H. contortus, T. circumcincta* and *T. colubriformis*

A PCR-based strategy has been used to identify homologues of the *C. elegans* L-AChR subunit genes in the ISI isolate of *H. contortus* (used in the ongoing genome sequencing project) and the TciSO and TcoSO isolates of *T. circumcincta* and *T. colubriformis*, respectively, taking advantage of the phylogenetic proximity of trichostrongylid nematodes with *C. elegans* [33]. The genes have been named following recommendations proposed by Beech *et al.* (Beech *et al.*, 2009, submitted). Orthologous genes were named after their *C. elegans* counterparts using a three letter prefix to identify the species of origin (*Hco: H. contortus, Tci: T. circumcincta* and *Tco: T. colubriformis*). Different paralogous trichostrongylid genes related to a single *C. elegans* L-AChR subunit genes were identified by a number following the gene name (e.g. *Hco-unc-29.1, Hco-unc-29.2* etc).

Twenty full-length cDNAs have been identified that encode genes homologous to *unc-38, unc-63, lev-1* and *unc-29*. The search for homologues of *lev-8* remained unsuccessful. More extensive work may yet find evidence for the presence of *lev-8* but the partially complete genome sequence available for *H. contortus* does not contain identifiable orthologues of *lev-8*. This lends support to the idea that this gene is indeed absent in the trichostrongylid parasites. The different L-AChR subunit sequences, accession numbers, characteristics and closest homologues in *C. elegans* and *A. caninum* are presented in Table 3.

A single orthologue has been identified for *unc-38, unc-63* and *lev-1* in each of the three trichostrongylid species. The full-length cDNA sequences of *Hco-unc-38, Tci-unc-38* and *Tco-unc-38* corresponded unambiguously to the previously

described *hca-1* (U72490) and the successfully completed sequences of *tar-1* (U56903) and *tea-1* (Y13851), respectively [20–22]. The *Hco-lev-1* and *Hco-unc-63* full-length cDNA sequences obtained from the ISI isolate were highly similar to previously annotated (complete or partial) cDNA sequences referenced in Table 3.

Sequences homologous to *unc-29* were unusual in that they seem to represent multiple gene copies in each of the three trichostrongylid parasites. Four *unc-29*-like genes were identified in *H. contortus* and *T. circumcincta* (*unc-29.1, unc-29.2, unc-29.3* and *unc-29.4*) and three from *T. colubriformis* (*unc-29.1, unc-29.2* and *unc-29.4*). Although our survey was extensive, we cannot rule out the possibility that there is a fourth paralogous (*unc-29.3*) in *T. colubriformis*.

Note that among the four *unc-29*-like genes identified in *H. contortus, Hco-unc-29.1* showed high similarities with a previously annotated cDNA sequence deposited in genbank under accession number EU006786. The transcripts of *Hco-unc-29.1, Hco-unc-29.2, Hco-unc-29.3* and *Hco-unc-29.4* mapped unambiguously to four distinct genes within a 60 kb segment of the *H. contortus* genome. This region is contained within a single 118 kb supercontig (Supercontig_0059649) of the 200808 build of the *H. contortus* genome data. These genomic data provide additional evidence supporting the hypothesis of local gene duplication events leading to a cluster of *unc-29*-like genes in the trichostrongylid nematodes.

The trichostrongylid AChR subunit sequences were highly similar to their *C. elegans* counterparts with percentage identities ranging from 70 to 84%. Identities were even higher (73–86%) with the recently characterized *AAR-unc-29, AAR-unc-38* and *AAR-unc-63* sequences of *A. caninum* [6]. An alignment of their deduced protein sequences showed that the L-AChR subunits identified in *H. contortus, T. circumcincta* and *T. colubriformis* possess typical features of AChR subunits (Fig. 1). These include an extracellular N-terminal region containing a disulfide loop consisting of two cysteines separated by 13 amino acids, four transmembrane domains (TM1–TM4) and a highly variable intracellular loop between TM3 and TM4

Table 3 Summary of the 20 AChR subunits identified in *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* and comparison with homologues of *Caenorhabditis elegans* and *Ancylostoma caninum*

Nematode species	Gene name	Accession number	Full length cDNA size (bp)	Deduced protein sequence length (amino acid)	<i>C. elegans</i> homologue amino acid identity/ similarity	<i>A. caninum</i> homologue % amino acid identity/ similarity		
<i>H. contortus</i> (<i>Hco</i>) ISE isolate	<i>Hco-unc-29.1</i> ^a	GU060980	2288	498	<i>UNC-29</i>	79/88	<i>AAR-29</i>	65/90
	<i>Hco-unc-29.2</i>	GU060981	1644	499	<i>UNC-29</i>	72/85	<i>AAR-29</i>	78/88
	<i>Hco-unc-29.3</i>	GU060982	1656	494	<i>UNC-29</i>	75/86	<i>AAR-29</i>	85/93
	<i>Hco-unc-29.4</i>	GU060983	1650	498	<i>UNC-29</i>	78/89	<i>AAR-29</i>	81/88
	<i>Hco-lev-1</i> ^b	GU060987	2007	472	<i>LEV-1</i>	77/86	NA	NA
	<i>Hco-unc-63a</i> ^c	GU060985	2317	504	<i>UNC-63</i>	80/87	<i>AAR-63</i>	85/88
	<i>Hco-unc-38</i> ^d	GU060984	1824	512	<i>UNC-38</i>	83/91	<i>AAR-38</i>	85/92
	<i>T. circumcincta</i> (<i>Tc</i>) TciSO isolate	<i>Tci-unc-29.1</i>	GU060988	2059	498	<i>UNC-29</i>	77/87	<i>AAR-29</i>
<i>Tci-unc-29.2</i>		GU060989	1642	498	<i>UNC-29</i>	74/88	<i>AAR-29</i>	78/89
<i>Tci-unc-29.3</i>		GU060990	1634	497	<i>UNC-29</i>	76/86	<i>AAR-29</i>	85/92
<i>Tci-unc-29.4</i>		GU060991	1651	497	<i>UNC-29</i>	77/88	<i>AAR-29</i>	83/90
<i>Tci-lev-1</i>		GU060995	1558	472	<i>LEV-1</i>	77/86	NA	NA
<i>Tci-unc-63a</i>		GU060993	2278	508	<i>UNC-63</i>	80/86	<i>AAR-63</i>	85/88
<i>Tci-unc-38</i> ^e		GU060992	1757	512	<i>UNC-38</i>	82/89	<i>AAR-38</i>	85/92
<i>T. colubriformis</i> (<i>Tco</i>) TcoSO isolate		<i>Tco-unc-29.1</i>	GU060996	1928	498	<i>UNC-29</i>	78/88	<i>AAR-29</i>
	<i>Tco-unc-29.2</i>	GU060997	1642	500	<i>UNC-29</i>	70/84	<i>AAR-29</i>	73/86
	<i>Tco-unc-29.4</i>	GU060998	1637	497	<i>UNC-29</i>	77/89	<i>AAR-29</i>	86/93
	<i>Tco-lev-1</i>	GU061002	1521	474	<i>LEV-1</i>	77/86	NA	NA
	<i>Tco-unc-63a</i>	GU061000	2277	502	<i>UNC-63</i>	80/87	<i>AAR-63</i>	85/88
	<i>Tco-unc-38</i> ^f	GU060999	1762	513	<i>UNC-38</i>	84/92	<i>AAR-38</i>	83/91

NA, not available.

^aSimilar to complete cDNA sequence (EU006786).^bSimilar to partial cDNA sequence (EU006792).^cSimilar to complete cDNA sequence (EU006787).^dSimilar to *hca-1* [20].^eSimilar to partial coding sequence *tca-1* [22].^fSimilar to partial coding sequence *lar-1* [21].

(Fig. 1). The presence of an *N*-terminal signal peptide has been predicted in all AChR subunits characterized in this study except for the *lev-1* homologues identified in *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*. To confirm that the correct 5' end had been identified for *lev-1* orthologues 5'RLM RACE PCR was used. For each case, a single amplification product was obtained corresponding to sequences previously identified using the SL1 primer (data not shown). The signal peptide sequences present in the other subunit proteins is missing from the LEV-1 sequences in the multiple sequence alignment in Fig. 1. These results provide new evidence that the *lev-1* orthologues of *H. contortus*, *T. colubriformis* and *T. circumcincta* lack a stretch of amino acid corresponding to a predictable signal peptide in their respective *N*-terminal regions and that this is a real feature of the protein and not simply a failure of the predictive software.

Phylogenetic analysis of trichostrongylid acetylcholine receptor subunits

Relationships between sequences of *H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis* and *C. elegans* L-AChR subunits were investigated in a phylogenetic analysis. The resulting tree presented Fig. 2 indicated orthologous or paralogous relationships between the L-AChR subunits. The relationships for *unc-38*, *unc-63* and *lev-1* showed that each species has inherited an ancestral copy of the gene and the tree topology agrees with what is known about the speciation events leading to the trichostrongylid parasites [34]. Phylogenetic analysis allows us to put a time con-

straint and to some extent reconstruct the events leading to the presence of multiple copies of *unc-29* identified in all three trichostrongylid parasites. The duplicated genes form a monophyletic clade, indicating that the events leading to the creation of these genes occurred after the split from the Rhabditida.

The *unc-29.1* genes from the three different parasites group together, with significant bootstrap support, and this is true for each of the other three *unc-29* paralogues. This could only happen if the gene duplication predated separation of the three trichostrongylid species.

Hence, it is likely that such a diversification of *unc-29*-like genes might have also occurred in the other trichostrongylid species.

Acetylcholine receptor subunit polymorphism associated with levamisole resistance in *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*

Expression of the 20 L-AChR subunits sequences identified in *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* was compared in adult worms from three LEV-S versus the two LEV-R isolates of each parasitic trichostrongylid species. Reverse transcription-PCR experiments were performed using primers designed in the 5' and 3' UTR of each gene allowing amplification of full-length cDNA coding sequences. For each L-AChR subunit we observed amplification products of the expected size in all parasite isolates (Fig. 3). Full-length cDNA for the AChR subunits were cloned from the LEV-S and LEV-R isolates to

compare their deduced amino acid sequences (data not shown). For each trichostrongylid species, the complete coding sequences were obtained in LEV-S and LEV-R isolates but no polymorphism unique to the LEV-R isolates has been identified. One significant difference between

the LEV-S and LEV-R isolates was the presence of smaller amplicons in addition to full-length *unc-63* transcripts in all three species. This occurred in the LEV-R isolate RH56 of *H. contortus*, TeiNZ of *T. circumcincta* and TcoGA of *T. colubriformis*, respectively (Fig. 3). Characterization of

Fig. 1

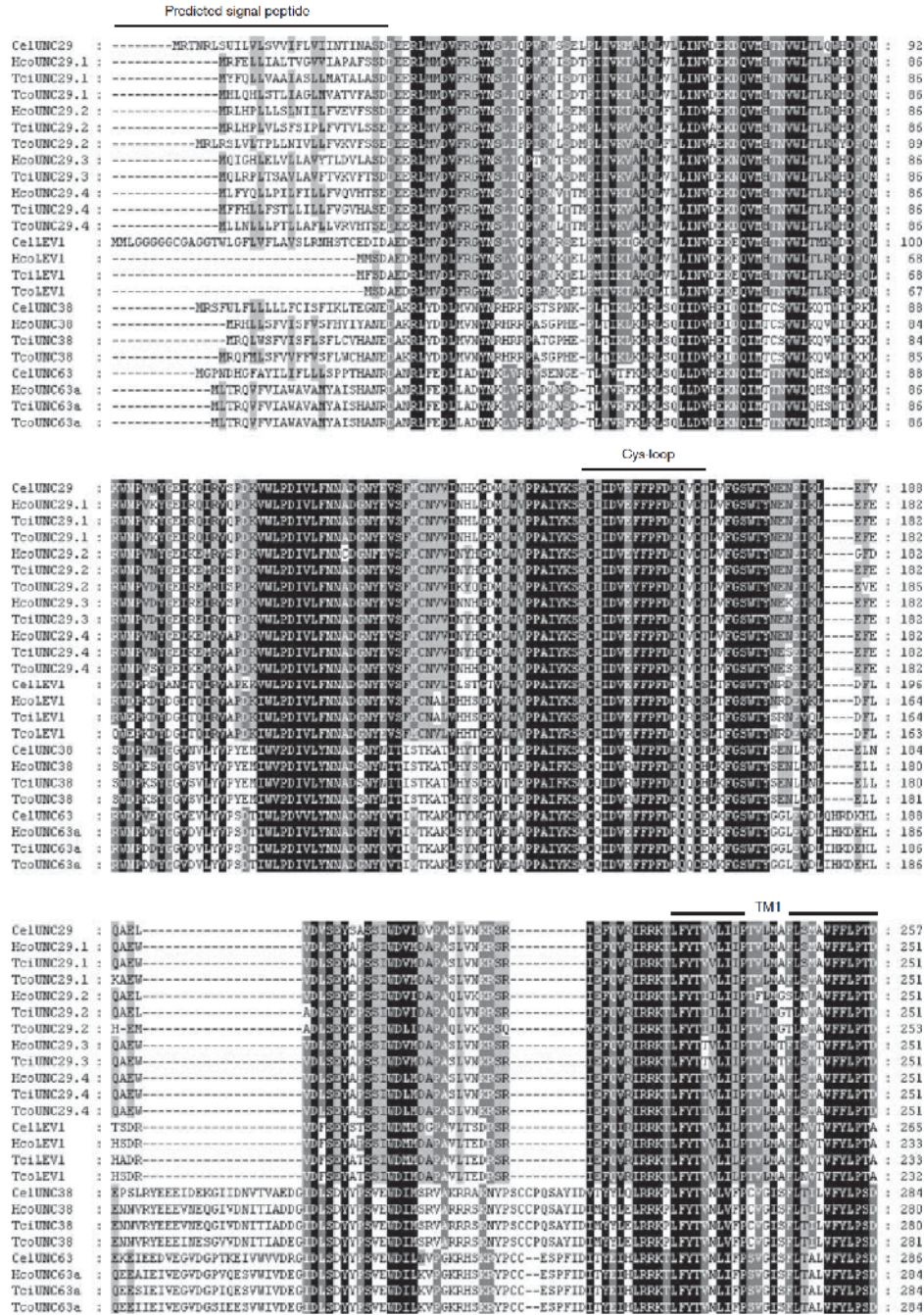
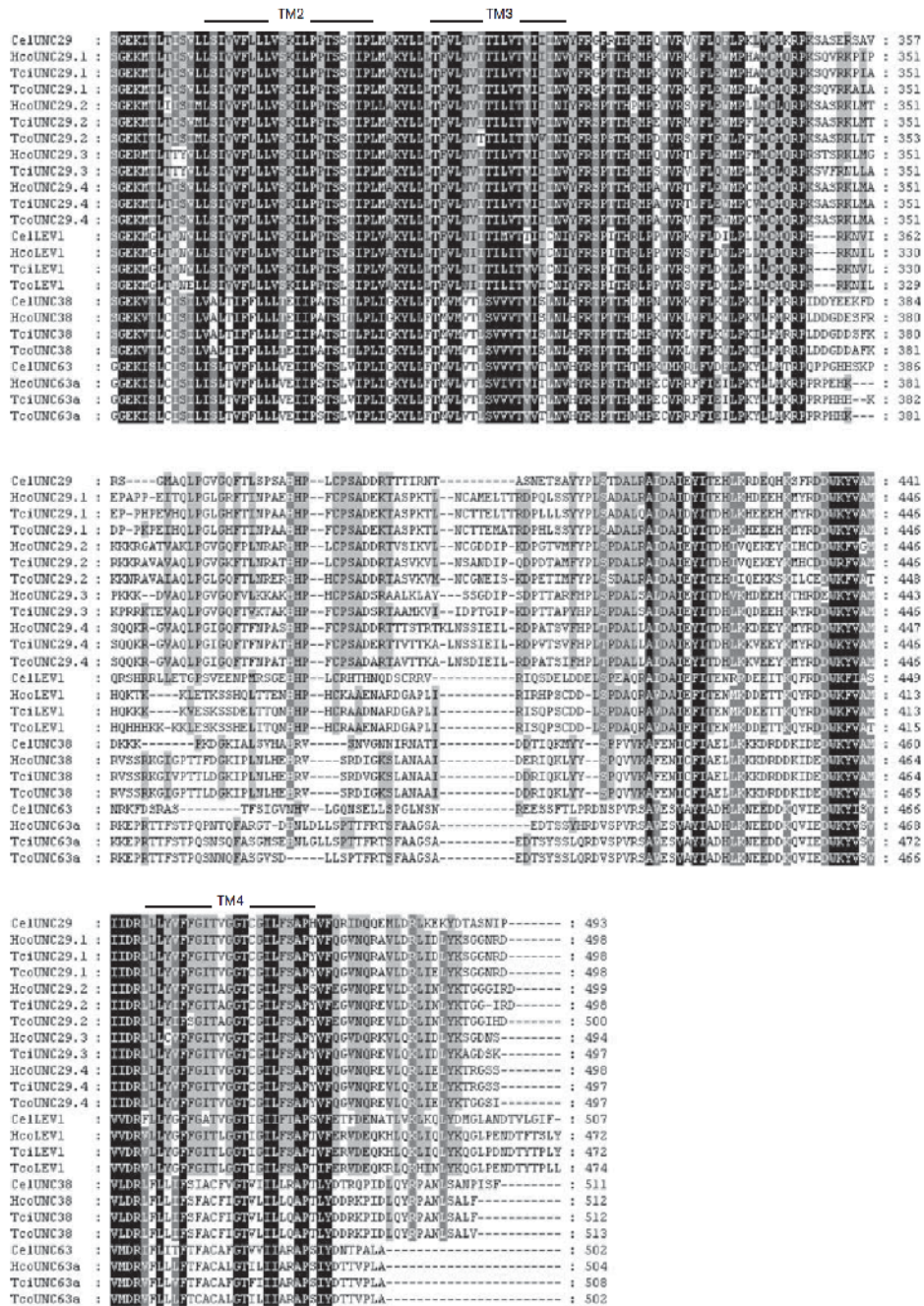
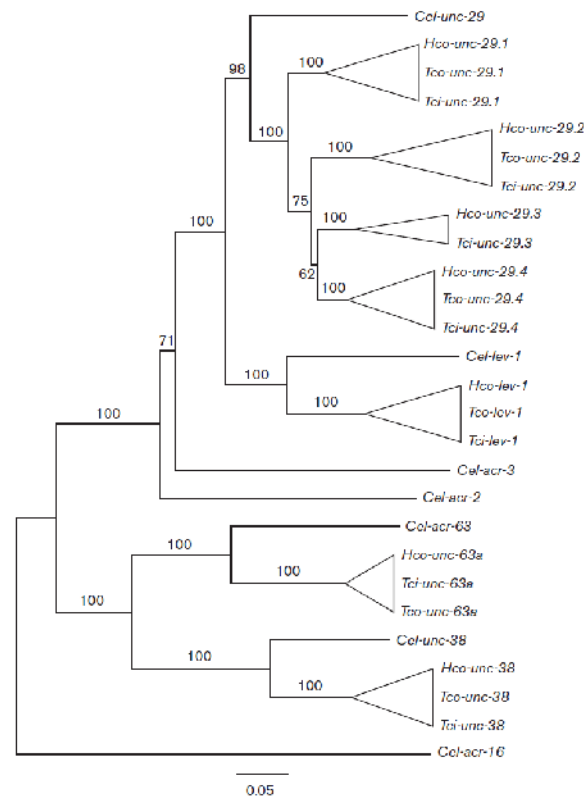


Fig. 1 (continued)



Deduced amino acid sequences of *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* UNC-29, LEV-1, UNC-38 and UNC-63 orthologues. The protein alignment, also including *Caenorhabditis elegans* UNC-29, LEV-1, UNC-38 and UNC-63 sequences, was constructed using the MUSCLE algorithm [31] and is shown using GeneDoc program (<http://www.nrbc.org/gfx/genedoc/index.html>). Regions of consensus at the amino acid level are shaded. The predicted signal peptide, the cys-loop and the four transmembrane regions (TM1–TM4) are highlighted.

Fig. 2



Tree showing relationships of acetylcholine receptor (AChR) subunit sequences in *Caenorhabditis elegans* and three species of parasitic strongyles (*Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*). Numbers at each branch indicate percentage bootstrap values corresponding to 1000 replicates. The scale bar represents substitutions per site. The *C. elegans* *acr-16* nAChR subunit was used as an outgroup. The *C. elegans*, *acr-2* and *acr-3* nAChR subunit genes were included in the phylogenetic analysis to provide further evidence that trichostrongylid *unc-29* paralogues are strictly related to the *C. elegans* *unc-29* gene and did not correspond to other orthologs closely related *C. elegans* genes.

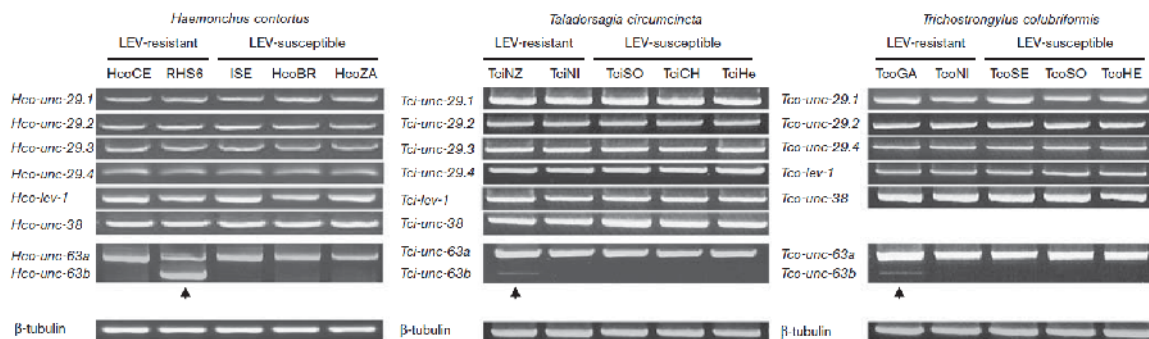
these additional amplification products showed that they corresponded to abbreviated transcripts of *unc-63*. Their complete cDNA sequences were named *Hco-unc-63b*, *Tci-unc-63b* and *Tco-unc-63b* and were submitted to genbank under accession number, GU060986, GU060994 and GU061001, respectively. Alignments of the three abbreviated isoforms of *unc-63* sequences with their respective full-length coding counterparts are schematically represented in Fig. 4a.

The *Hco-unc-63b* sequence perfectly matched with the 5' and 3' ends of the full-length *Hco-unc-63a* sequence but presented a large deletion of 1124bp including the original stop codon and the first 557 nucleotides from the 3' UTR. The putative protein encoded by *Hco-unc-63b* possessed an open reading frame of 343 amino acids including a signal peptide, the N-terminal extracellular part, two transmembrane domains (TM1 and TM2) and 26 amino acids resulting from translation of the 3' UTR (Fig. 4b).

Compared with the full-length *Tci-unc-63a* sequence, *Tci-unc-63b* harboured a deletion of 1076 bp including the original stop codon and 351 bp from the 3' UTR. As illustrated in Fig. 4b, the *Tci-UNC-63b* deduced protein sequence harboured 295 amino acids containing a signal peptide and the N-terminal part including the first 11 amino acids of the TM1 followed by 26 amino acids resulting from translation of the 3' UTR (i.e. as observed for *Hco-unc-63b*).

The *Tco-unc-63b* abbreviated transcript differed from its full-length coding counterpart (*Tco-unc-63a*) by an internal deletion of 471 bp but in contrast with *Hco-unc-63b* and *Tci-unc-63b* the original stop codon and the complete 3' UTR region are conserved. As the deletion of 471 bp did not lead to a shift of reading frame, the *Tco-UNC-63b* deduced protein sequence was identical to *Tco-UNC-63a* but lacked 157 amino acids, including the second half of TM1 (i.e. as observed for *Tci-UNC-63b*), the transmembrane domains

Fig. 3



Expression of levamisole (LEV)-sensitive acetylcholine receptor (L-AChR) subunits in LEV-resistant (LEV-R) and LEV-susceptible (LEV-S) isolates of *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* as determined by RT-PCR experiments. Amplification products were obtained with primers designed on 5' and 3' untranslated region, respectively. Amplification of β -tubulin cDNA was used as control. A similar expression pattern of full-length coding L-AChR subunits was observed in both LEV-S and LEV-R isolates of the three trichostrongylid species. Black arrows indicate additional amplification products corresponding to abbreviated cDNA of *Cel-unc-63* orthologs in LEV-R isolate of each trichostrongylid species.

2 and 3 (TM2 and TM3) and a stretch of 89 amino acids following TM3. The absence of premature terminal stop codons makes it unlikely that translated products of the abbreviated transcripts could be degraded by the nonsense-mediated decay machinery [35]. These abbreviated proteins might be expressed *in vivo* and play a functional role in protection of the parasite from the anthelmintic action of LEV.

Discussion

Genetic screens for LEV resistant mutants of *C. elegans* have provided a basis of considerable value for many molecular investigations that have led to functional expression and characterization of a LEV-S receptor [9,11]. These *C. elegans* data provide a means to decipher L-AChR subunit composition in parasitic nematodes as well as the molecular mechanisms underlying their resistance to LEV. In this study, orthologues of the *C. elegans* L-AChR subunit genes *unc-29*, *unc-63*, *unc-38*, *lev-1* were identified in three trichostrongylid species of major veterinary importance: *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*. Although the trichostrongylid L-AChR subunit sequences reported in this study showed very high sequence similarity with their *C. elegans* counterparts, striking differences were also observed.

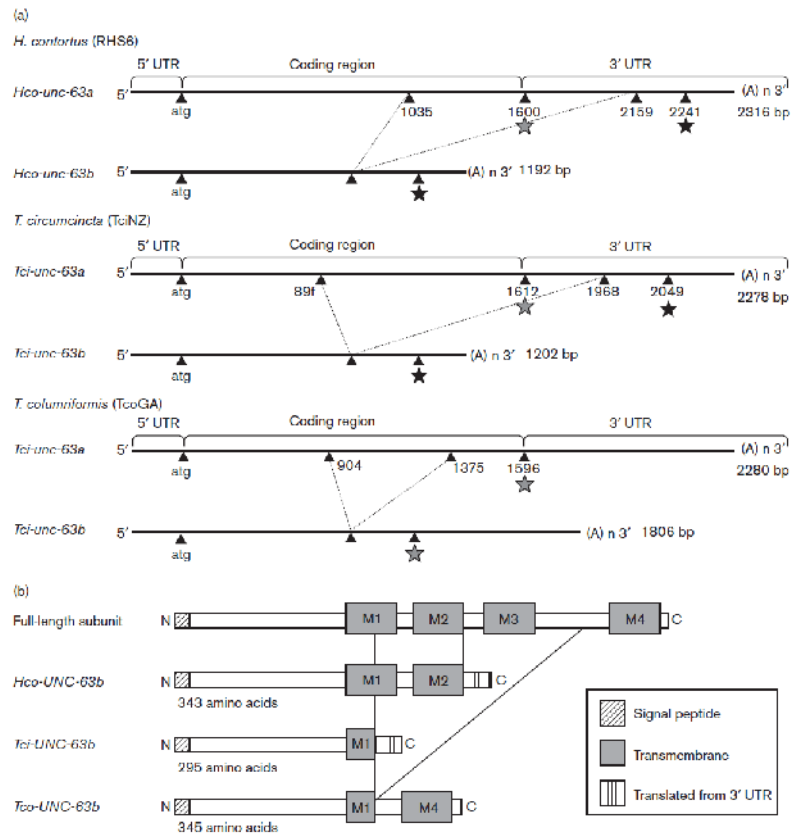
First, our cloning strategy revealed an unexpected diversity of *unc-29*-like homologues in *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*. Eleven distinct paralogues of *Cel-unc-29* were identified, defining four distinct *unc-29*-like genes. The UNC-29.1, UNC-29.2 and UNC-29.4 groups included one paralogue from each trichostrongylid species. UNC-29.3 was only observed in *H. contortus* and *T. circumcincta*. This is, to our knowledge, the first report of such an extensive diversification of

AChR genes in the nematode phylum. Phylogenetic analysis suggests that after the separation of the Strongylida from the Rhabditida and before separation of the trichostrongylid species examined here, there were a series of two or more gene duplication events creating a panel of *unc-29* like genes. Function of the L-AChR depends critically on UNC-29 and changes as subtle as the number of UNC-29 subunits present can affect channel pharmacology [16]. The presence of multiple *unc-29* genes would present the possibility of significant change in the control of cholinergic nerve signal transmission.

Second, we highlighted the apparent absence of predicted signal peptide in *lev-1* homologues of *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*. As this lack of signal peptide was specifically observed in all *lev-1* orthologues identified in the three trichostrongylid species, it is unlikely that our observation could result from an incomplete characterization. Hence, it raises the question of their effective participation to functional receptors. As AChR subunits assembly and oligomerization take place within the endoplasmic reticulum [36,37], the absence of signal peptide in Hco-LEV-1, Tci-LEV-1 and Tco-LEV-1 could either indicate that they are not involved in L-AChR constitution or could associate to other L-AChR subunits using a molecular pathway that remains to be identified. Clearly, further investigations including immunolocalization of trichostrongylid *lev-1* homologues will be of great interest to answer these questions.

Third, we could find no evidence for a gene orthologous to *lev-8* despite intensive laboratory and bioinformatic searches. However, sequences obtained from *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* were highly similar to the closely related *Cel-acr-8* gene (data not shown). In *C. elegans* it has been shown that in addition to the L-AChR

Fig. 4



(a) Schematic representation of full-length and abbreviated *Cef-unc-63* orthologs mRNA expressed in levamisole-resistant isolates of *H. contortus*, *T. colubriformis* and *T. circumcincta*. Grey stars indicate original stop codon, black stars indicate alternative stop codon located in 3' untranslated region (UTR) region. Nucleotide positions indicated by black arrows were determined using the first nucleotide of the spliced leader sequence (SL1) as reference. (b) Schematic representation of *Hco-UNC-63b*, *Tco-UNC-63b* and *Tci-UNC-63b* deduced truncated proteins.

subunits previously known to contribute to LEV receptor composition, UNC-29 can interact with the ACR-8 subunit [38]. Moreover it was recently suggested that ACR-8 could replace another subunit in the L-AChR of *C. elegans* [39]. It is tempting to hypothesize that *acr-8* homologues identified in *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* could replace the function of LEV-8. Given this, in addition to the presence of multiple copies of the *unc-29* gene, it is likely that the molecular details of L-AChR function are quite different in the trichostrongylid parasites and could even differ from one species to another. Therefore, we should be careful in using the free living *C. elegans* and parasite systems such as *Ascaris suum* in making conclusions about the action of LEV in the trichostrongylid parasites of livestock.

In this study, comparative analysis showed that full-length coding sequences corresponding to *unc-29*, *unc-38*, *lev-1* and *unc-63* were expressed in both LEV-S and LEV-R

isolates of *H. contortus*, *T. colubriformis* and *T. circumcincta*. However, in addition to full-length coding mRNAs corresponding to *unc-63*, abbreviated isoforms were found to be specifically expressed in LEV-R isolates of *H. contortus*, *T. colubriformis* and *T. circumcincta*. Truncated transcripts resulting from alternative splicing events have been reported for several insect AChR subunits [40–43], though their precise function remains to be established. In a recent study of *H. contortus*, coexpression of full-length coding mRNA with truncated isoforms of the *Hco-mptl-1* AChR gene was specifically observed in a laboratory selected isolate with reduced sensitivity to the new anthelmintic monopantel [44]. Altogether with our data it seems that expression of truncated AChR subunits could constitute a response to a selective pressure exerted by anthelmintic compounds and, therefore, should be considered as prime leads for resistance investigations. Interestingly, it has been reported that a constitutive truncated variant of the mouse brain nAChR

α -7 subunit had a dominant negative effect on full-length α -7 subunit when cotransfected within HEK 293 cells [45]. We can speculate that truncated proteins encoded by *Hco-unc-63b*, *Tci-unc-63b* and *Tco-unc-63b* could act in a similar manner on their respective parental L-AChR subunits. Strong arguments supporting this hypothesis are provided by different studies using dominant negative assays to investigate vertebrate AChR subunits assembly [46,47]. For instance, it has been shown that truncated subunits consisting solely of the extracellular N-terminal region altered functional properties of the receptor when coexpressed with the parental subunit in *Xenopus* oocytes and could even block functional expression when the first transmembrane domain (TM1) was added to N-terminal region [47]. As *Hco-unc-63b*, *Tci-unc-63b* and *Tco-unc-63b* sequences shared common structural features including a signal peptide, a complete N-terminal extracellular region and all or part of TM1, we can reasonably assume they could exert a dominant negative effect on their respective full-length counterparts leading to L-AChR altered functionality, probably resulting in LEV resistance in RHS6, TeiNZ and TcoGA isolates of *H. contortus*, *T. colubriformis* and *T. circumcincta*, respectively. This is, to our knowledge, the first report of a truncated L-AChR subunit associated with LEV resistance in parasitic nematodes. As trichostrongylid nematodes are not prone to stable or transitory genetic transformations [48,49], recent advances in a nematode L-AChR expression system [9] will offer the opportunity to test the implication of truncated subunits in L-AChR destabilization or lack of cell surface expression. If that is the case, such a result would provide a strong argument to investigate the presence of *unc-63b* abbreviated transcripts in adult females and other developmental stages of these LEV-R isolates.

For the other LEV-R isolates of *H. contortus*, *T. colubriformis* and *T. circumcincta*, investigation of L-AChR subunits failed to identify any differential expression levels, alternative transcripts or sequence polymorphisms associated with LEV resistance. These subunits are therefore unlikely to be involved in the LEV resistance phenotype. This result also emphasizes the need to expand the focus to include the trichostrongylid *acr-8* orthologues (Fauvin *et al.* submitted) and the other genes identified in LEV-R mutant screening of *C. elegans* [10,50], such as ancillary proteins (*unc-50*, *unc-74* and *ric-3*), contractile elements (*unc-22*, *lev-11*), synaptic receptor aggregation proteins (*lev-9*, *lev-10*), the ryanodine receptor (*unc-68*) and other interacting proteins (*mra-1*, *soc-1*, *tax-6*, *tpa-1*) [8]. Moreover, taking into account that genes involved in LEV resistance might be different in trichostrongylid parasites; combination of the present candidate gene strategy with a global transcriptomic approach [24] will undoubtedly contribute to uncover molecular determinants of LEV resistance.

In conclusion, our results highlight the diversity and complexity of L-AChR subunit genes in parasitic trichostrongylid species and lay a foundation for their further

characterization, including functional reconstitution of trichostrongylid parasites L-AChR. This will provide a means to explore cholinergic agonist resistance and optimize the design of new nematocidal compounds.

Acknowledgements

The authors are thankful for the support of the different researchers who provided the *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* isolates. The constructive suggestions of Alexandra Blanchard are greatly appreciated. The technical help of Christine Sauvé in preparing isolates from French Basque region and checking for LEV resistance status is gratefully acknowledged. Aymeric Fauvin is a grateful recipient of a PhD grant from 'Région Centre' and Animal Health Division of INRA.

References

- Robertson SJ, Martin RJ. Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*. *Br J Pharmacol* 1993; 108:170-178.
- Kaplan RM. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 2004; 20:477-481.
- Cabaret J, Gasnier N, Jacquet P. Faecal egg counts are representative of digestive-tract strongyle worm burdens in sheep and goats. *Parasite* 1998; 5:137-142.
- Sangster NC, Song J, Domoler J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. *Parasitology* 2005; 131 (Suppl):S179-S190.
- Martin RJ, Verma S, Levandoski M, Clark CL, Qian H, Stewart M, *et al.* Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole. *Parasitology* 2005; 131 (Suppl):S71-S84.
- Kopp SR, Coleman GT, Traub RJ, McCarthy JS, Kotze AC. Acetylcholine receptor subunit genes from *Ancylostoma caninum*: altered transcription patterns associated with pyrantel resistance. *Int J Parasitol* 2009; 39:435-441.
- Hu Y, Xiao SH, Aroian RV. The new anthelmintic tribendimidine is an L-type (levamisole and pyrantel) nicotinic acetylcholine receptor agonist. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3:e499.
- Martin RJ, Robertson AP. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology* 2007; 134:1093-1104.
- Boulin T, Gielen M, Richmond JE, Williams DC, Paoletti P, Bessereau JL. Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:18590-18595.
- Lewis JA, Wu CH, Berg H, Levine JH. The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1980; 95:905-928.
- Jones AK, Buckingham SD, Sattelle DB. Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:321-330.
- Fleming JT, Squire MD, Barnes TM, Tomoe C, Matsuda K, Ahnn J, *et al.* *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Neurosci* 1997; 17:5843-5857.
- Richmond JE, Jorgensen EM. One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* 1999; 2:791-797.
- Culetto E, Baylis HA, Richmond JE, Jones AK, Fleming JT, Squire MD, *et al.* The *Caenorhabditis elegans* *unc-63* gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *J Biol Chem* 2004; 279:42476-42483.
- Towers PR, Edwards B, Richmond JE, Sattelle DB. The *Caenorhabditis elegans* *lev-8* gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurochem* 2005; 93:1-9.
- Williamson SM, Robertson AP, Brown L, Williams T, Woods DJ, Martin RJ, *et al.* The nicotinic acetylcholine receptors of the parasitic nematode *Ascaris suum*: formation of two distinct drug targets by varying the relative expression levels of two subunits. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000517.

- 17 Sangster NC, Riley FL, Collins GH. Investigation of the mechanism of levamisole resistance trichostrongylid nematodes of sheep. *Int J Parasitol* 1988; **18**:813–818.
- 18 Sangster NC, Riley FL, Wiley LJ. Binding of [³H]m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1998; **28**:707–717.
- 19 Robertson AP, Bjorn HE, Martin RJ. Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. *Faseb J* 1999; **13**:749–760.
- 20 Hoekstra R, Visser A, Wiley LJ, Weiss AS, Sangster NC, Roos MH. Characterization of an acetylcholine receptor gene of *Haemonchus contortus* in relation to levamisole resistance. *Mol Biochem Parasitol* 1997; **84**:179–187.
- 21 Wiley LJ, Weiss AS, Sangster NC, Li Q. Cloning and sequence analysis of the candidate nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit gene *lar-1* from *Trichostrongylus colubriformis*. *Gene* 1996; **182**:97–100.
- 22 Walker J, Hoekstra R, Roos MH, Wiley LJ, Weiss AS, Sangster NC, *et al.* Cloning and structural analysis of partial acetylcholine receptor subunit genes from the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Parasitol* 2001; **97**:329–335.
- 23 Roos MH, Olsen M, Hoekstra R, Veenstra JG, Lenstra JA. Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 2004; **34**:109–115.
- 24 Neveu C, Charvet C, Fauvin A, Cortet J, Castagnone-Soreno P, Cabaret J. Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA-AFLP approach. *Parasitology* 2007; **134**:1105–1110.
- 25 Hoekstra R, Borgsteede FH, Boersema JH, Roos MH. Selection for high levamisole resistance in *Haemonchus contortus* monitored with an egg-hatch assay. *Int J Parasitol* 1997; **27**:1395–1400.
- 26 Paraud C, Kulo A, Pors I, Chartier C. Resistance of goat nematodes to multiple anthelmintics on a farm in France. *Vet Rec* 2009; **164**:563–564.
- 27 Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**:10881–10890.
- 28 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**:3389–3402.
- 29 Bondtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 2004; **340**:783–795.
- 30 Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 1996; **12**:543–548.
- 31 Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**:1792–1797.
- 32 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; **4**:406–425.
- 33 Blaxter M, Aslett M, Guiliano D, Daub J. Parasitic helminth genomics. Filarial Genome Project. *Parasitology* 1999; **118** (Suppl):S39–S51.
- 34 Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, *et al.* A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 1998; **392**:71–75.
- 35 Hillman RT, Green RE, Brenner SE. An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol* 2004; **5**:R8.
- 36 Smith MM, Lindstrom J, Merlie JP. Formation of the alpha-bungarotoxin binding site and assembly of the nicotinic acetylcholine receptor subunits occur in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1987; **262**:4367–4376.
- 37 Green WN, Millar NS. Ion-channel assembly. *Trends Neurosci* 1995; **18**:280–287.
- 38 Gottschalk A, Almedom RB, Schedletzky T, Anderson SD, Yates JR III, Schafer WR. Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* 2005; **24**:2566–2578.
- 39 Almedom RB, Liewald JF, Hernando G, Schultheis C, Rayes D, Pan J, *et al.* An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse. *Embo J* 2009; **28**:2636–2649.
- 40 Shao YM, Dong K, Zhang CX. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 2007; **8**:324.
- 41 Jones AK, Raymond-Delpech V, Thary SH, Gauthier M, Sattelle DB. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* 2006; **16**:1422–1430.
- 42 Lansdell SJ, Millar NS. Cloning and heterologous expression of *Dalpha4*, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology* 2000; **39**:2604–2614.
- 43 Grauso M, Reenan RA, Culotto E, Sattelle DB. Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, *Dalpha5*, *Dalpha6* and *Dalpha7*, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics* 2002; **160**:1519–1533.
- 44 Rufener L, Maser P, Roditi I, Kaminsky R. *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. *PLoS Pathog* 2009; **5**:e1000380.
- 45 Saragoza PA, Modir JG, Goel N, French KL, Li L, Nowak MW, *et al.* Identification of an alternatively processed nicotinic receptor alpha7 subunit RNA in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; **117**:15–26.
- 46 Verrall S, Hall ZW. The N-terminal domains of acetylcholine receptor subunits contain recognition signals for the initial steps of receptor assembly. *Cell* 1992; **68**:23–31.
- 47 Sumikawa K, Nishizaki T. The amino acid residues 1-128 in the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor contain assembly signals. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; **25**:257–264.
- 48 Knox DP, Geldhof P, Visser A, Britton C. RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check? *Trends Parasitol* 2007; **23**:105–107.
- 49 Vinoy ME, Thompson FJ. Two hypotheses to explain why RNA interference does not work in animal parasitic nematodes. *Int J Parasitol* 2008; **38**:43–47.
- 50 Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974; **77**:71–94.

Résultats / Discussion de l'article 1

Bien que *Caenorhabditis elegans* soit un nématode libre, il est phylogénétiquement très proche des espèces de strongles d'intérêt pour les animaux de rente. L'étude des gènes impliqués dans la résistance au lévamisole chez *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis* à partir des gènes déjà identifiés chez *C. elegans* semble donc pertinente. Au cours de cette étude nous avons cherché à identifier les homologues des sous-unités LEV-1, LEV-8, UNC-29, UNC-38 et UNC-63 du récepteur au lévamisole (L-AChR) de *C. elegans* chez les 3 espèces de strongles digestifs *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*. L'objectif était de corrélérer un éventuel polymorphisme nucléotidique retrouvé chez certains de nos isolats résistants à la résistance au lévamisole.

Cette étude nous a permis d'identifier et de décrire 20 homologues des sous-unités de *C. elegans* chez nos 3 espèces confondues. Elle a également permis de déceler des différences majeures entre le nématode modèle et les strongles digestifs.

1) Chez *C. elegans*, il a été démontré que certaines sous-unités sont indispensables au récepteur au lévamisole (UNC-29, UNC-38 & UNC-63) et d'autres non (LEV-1 & LEV-8) (Qian *et al.*, 2008). Les résultats obtenus chez les trichostrongles tendent à confirmer cette hypothèse puisque malgré de nombreuses tentatives, aucun homologue du gène *lev-8* n'a été identifié. Les études moléculaires de la résistance au lévamisole réalisées chez d'autres espèces de nématodes parasites (*Ascaris suum*, *Ancylostoma caninum*, *Oesophagostomum dentatum*) ainsi que la recherche dans les banques de données (*Brugia malayi*, *Trichinella spiralis*) semblent indiquer que ce phénomène est général chez les nématodes parasites (Williamson *et al.*, 2007). De plus, l'homologue correspondant au gène *lev-1* ne possède pas de peptide signal de sécrétion et ce chez les 3 espèces étudiées. Etant donné que le peptide signal de sécrétion d'une protéine participe à son bon adressage dans la cellule, le rôle de la protéine issue des gènes *lev-1* des trichostrongles reste à déterminer.

2) Un autre résultat important est la mise en évidence de 4 paralogues du gène *unc-29* chez *H. contortus* et *T. circumcincta* ainsi que 3 chez *T. colubriformis*. Ces paralogues sont probablement issus d'événement de duplication et présentent 86% à 91% de similarité entre leurs séquences protéiques au sein d'une même espèce. Les fonctions *in vivo* de ces différents paralogues sont inconnues et leurs éventuelles implications dans le récepteur au lévamisole chez ces espèces seront étudiées au laboratoire.

3) La découverte d'une forme tronquée de l'ADNc du gène *unc-63* chez un isolat résistant de chaque espèce de strongles digestifs laisse envisager que cette forme pourrait jouer un rôle dans le phénotype de résistance au lévamisole chez ces isolats. Ces formes tronquées sont co-exprimées avec les formes complètes des messagers. Cependant il est possible que les protéines issues de ces formes tronquées, ne possédant pas toutes les caractéristiques structurales des sous-unités, entrent en compétition avec la forme pleine longueur pour s'incorporer au récepteur final. La sous-unité UNC-63 a été décrite comme essentielle pour le récepteur au lévamisole chez le nématode *C. elegans*, elle joue donc un rôle important dans le mode d'action de cette molécule. Il est envisageable que la présence de ces récepteurs non fonctionnels réduise l'action du lévamisole sur le nématode et permettent à certains individus de résister à l'action de ce composé.

Pour les autres isolats résistants n'exprimant pas la forme tronquée d'UNC-63, le mécanisme à l'origine de l'apparition de la résistance demeure à ce jour inconnu. L'étude des séquences nucléotidiques des sous-unités UNC-38, LEV-1 et des paralogues d'UNC-29 n'a pas révélé de polymorphisme associé à la résistance au lévamisole chez les isolats testés. Cependant chez *C. elegans*, d'autres protéines ont été associées à des phénotypes de résistance (UNC-50, LEV-9, LEV-10 & UNC-74) (Lewis *et al.*, 1987a). Il existe également de nombreux gènes impliqués dans la cascade de fonctionnement du lévamisole comme, des protéines accessoires qui participent à la mise en place du récepteur (RIC-3, NRA-2, OIG-4, etc.) ou à sa régulation (TAX-6, SOC-1, TPA-1) (Gottschalk *et al.*, 2005, Almedom *et al.*, 2009, Rapti *et al.*, 2011). Ces gènes, qu'ils soient impliqués ou non dans un phénotype de résistance au lévamisole chez *C. elegans*, peuvent également être des candidats. Des modifications au niveau de ces gènes pourraient être à l'origine de la résistance au lévamisole chez ces isolats.

ARTICLES 2 & 3

Introduction de l'article 2 et 3

Dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la résistance au lévamisole chez *H. contortus*, une étude transcriptomique globale par analyse différentielle des transcrits d'isolats sensibles et résistants au lévamisole a été réalisée. Cette comparaison a été effectuée par la technique de cDNA-AFLP (Bachem *et al.*, 1996, Money *et al.*, 1996). Cette technique a déjà été utilisée dans de nombreuses études comme pour identifier des gènes impliqués dans la pathogénicité des nématodes phytoparasites (Qin *et al.*, 2000), ou encore pour détecter des gènes responsables de la résistance aux insecticides chez le papillon *Helicoverpa armigera* (Wee *et al.*, 2008).

Le cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism à partir d'ADNc) est une technique qui permet de comparer le transcriptome de plusieurs isolats de la même espèce, proches génétiquement, afin d'identifier des séquences codantes exprimées de manière différentielle. Cette technique consiste à digérer les ADNc avec 2 enzymes de restriction, les fragments obtenus sont amplifiés par PCR puis séparés par électrophorèse. Les profils de migration des différents isolats testés permettent de déceler les fragments différentiellement exprimés.

Dans le cadre de cette étude, la technique de cDNA-AFLP a été effectuée sur *Haemonchus contortus* : l'espèce de strongle digestif la plus pathogène. Quatre populations isolées indépendamment dans des élevages de provenances géographiques diverses ont été utilisées : 2 isolats sensibles au lévamisole (Morehun et Zaire) provenant respectivement d'Ecosse et de la république démocratique du Congo. Et 2 isolats résistants au lévamisole (Kokstad et Cedara), isolés indépendamment de deux élevages d'Afrique du Sud.

L'ensemble des résultats est présenté dans les 2 articles suivants :

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.

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**, 105-107.

Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA-AFLP approach

C. NEVEU^{1*}, C. CHARVET¹, A. FAUVIN¹, J. CORTET¹, P. CASTAGNONE-SERENO²
and J. CABARET¹

¹INRA, IASP, 213, UR 1282, F-37380 Nouzilly, France.

²INRA, UMR1064 Interactions Plantes-Microorganismes et Santé Végétale, 400 route des Chappes, BP167, 06903 Sophia Antipolis, France.

SUMMARY

A cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism)-based strategy has been used to identify levamisole (LEV) resistance markers in the nematode *Haemonchus contortus*. Transcript profiles of adult nematodes from two LEV-resistant and two susceptible isolates were compared. Among the 17 280 transcript-derived fragments (TDFs) amplified, 26 presented a polymorphic pattern between resistant and susceptible nematodes: 11 TDFs were present in both resistant isolates and absent from both susceptible isolates whereas 15 TDFs were present in both susceptible isolates and absent from both resistant isolates. 8 TDFs specifically present in resistant isolates were cloned and sequenced. Some of these TDFs could represent novel genes, as their sequences presented no homologies in databases. Interestingly, specific expression of one candidate (HA17) in resistant nematodes from different isolates was confirmed by RT-PCR experiments. The finding that HA17 expression correlates with LEV resistance in three *H. contortus* isolates *vs* five susceptible isolates strongly suggest that we identified a new potential marker of LEV resistance. This differential approach at the transcriptome level could be of great interest for the identification of the molecular mechanism involved in this phenotype.

Key words: Nematode, *Haemonchus*, levamisole, resistance, cDNA-AFLP, marker.

INTRODUCTION

Levamisole (LEV) is a broad-spectrum anthelmintic drug widely used to eradicate parasitic nematodes in livestock. However, the high efficacy of LEV against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep and goats has been compromised by the development of resistance in field populations. Compared to the other two commonly used anthelmintic classes [benzimidazole (BZ) and avermectin (AVM)], the rate of resistance selection for LEV appears to be slower in *H. contortus*. For this reason LEV is of particular interest to control BZ- and AVM-resistant isolates. In order to sustain the efficacy of LEV treatments, identification of resistance molecular mechanisms, and thus resistance markers, in parasitic nematodes are urgently needed.

LEV acts on nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) and resistance is thought to be associated with changes in LEV binding characteristics or in the number of receptors (Coles, East and Jenkins, 1975; Lewis *et al.* 1980; Sangster *et al.* 1988, 1998; Robertson, Bjorn and Martin, 1999). Studies on the mode of action and resistance to LEV in parasitic

nematodes were recently reviewed (Martin *et al.* 2005; Sangster, Song and Demeler, 2005).

In *C. elegans*, many genes can be involved in LEV resistance (Jones and Sattelle, 2004). Among those genes, some encode nAChR subunits (*unc-38*, *unc-29*, *unc-63*, *lev-1* and *lev-8*) (Lewis *et al.* 1980; Fleming *et al.* 1997; Culetto *et al.* 2004; Towers *et al.* 2005). Nevertheless, studies of the sequence of an *H. contortus* receptor α subunit orthologous to *unc-38* failed to identify differences between resistant and susceptible nematodes (Hoekstra *et al.* 1997a). Consequently, the molecular mechanisms involved in LEV resistance in *H. contortus* remain largely unknown and resistance markers are still to be identified.

The goal of the present study was the identification of genes that are differentially expressed in LEV-resistant compared to susceptible nematodes, in order to define potential resistance markers. We used resistant and susceptible isolates of *H. contortus* from different geographic origins to detect genes that show similar expression in all resistant isolates, but which differ in all susceptible isolates.

A comparative analysis of the transcriptome of susceptible and LEV-resistant *H. contortus* was performed using the cDNA-AFLP method (Bachem *et al.* 1996). This RNA-based technique allows the detection of differences in expression as well as

* Corresponding author: INRA, IASP, 213, UR 1282, F-37380 Nouzilly, France. Tel: +33 (0)2 47427768. Fax: +33 (0) 2 47427774. E-mail: cedric.neveu@tours.inra.fr

Table 1. Characteristics of *Haemonchus contortus* isolates

Isolates	Code	Region	Levamisole resistance status	Reference/provider
Kokstad	K	South Africa-Johannesburg	Resistant	Jan Van Wyk
Cedera	C	South Africa-Johannesburg	Resistant	Jan Van Wyk
RHS6*	RHS6	Zimbabwe	Resistant	Hockstra <i>et al.</i> 1997/Fred Borgsteede
Moredun	M	Great Britain	Susceptible	Frank Jackson
Zaire	Z	Zaire-Ituri	Susceptible	INRA collection
Bordaicoborda	Br	Fortaleza	Susceptible	INRA collection
Brésil	Bo	Basque country	Susceptible	INRA collection/Claudia Bevilaqua
Herian	H	Basque country	Susceptible	INRA collection

* Artificially selected from the susceptible isolate SHS from Zimbabwe (Hockstra *et al.* 1997b).

polymorphisms in comparative analysis. This cDNA-AFLP approach proved to be very efficient for the detection of differentially expressed gene in plant parasitic nematodes such as *Globodera rostochiensis* (Qin *et al.* 2000) and *Meloidogyne incognita* (Neveu *et al.* 2003). Here we report the identification of transcript derived fragments (TDFs) that distinguish LEV-resistant from susceptible *H. contortus* isolates, and a marker of interest was investigated in detail to validate our strategy.

MATERIALS AND METHODS

Nematodes (Table 1)

Three LEV-resistant isolates, Cedera and Kokstad from the Republic of South Africa and RHS6 from Zimbabwe (selected for LEV-resistance under laboratory conditions) were used to find resistance markers. The Moredun strain was used as one susceptible isolate; it has been maintained under experimental conditions for decades without anthelmintic treatments. The Zaire (now Congo) isolate from the Ituri region was also susceptible; it originated from a region where anthelmintic treatments were rare and no LEV treatment had been performed for 20 years at the time it was collected. It was then maintained under experimental conditions for 10 years without any treatment. The Brazil isolate (Fortaleza) and French isolates from the Basque region in the South-West of France were recently introduced into the laboratory (Silvestre *et al.* 2000). The resistance status was evaluated in pairs of experimentally infected lambs, one being treated with LEV and the other untreated. Faecal egg counts and worm counts at necropsy were used to assess resistance.

RNA purification

For each nematode isolate, total RNA was extracted from ten adult *H. contortus* males. Frozen worms were homogenized in Trizol reagent (Invitrogen) and total RNA isolated as per the manufacturer's recommendations. RNA pellets were dissolved in

50 μ l of RNA secure solution (Ambion) and stored at -80°C . RNA samples were checked for contamination with genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) using β -tubulin primers annealing in exons 5 and 6 (Table 2). Amplification of a 286 bp DNA fragment containing intron 5 was never observed and only a PCR product of 219 bp lacking the 67 bp intron 5 was obtained in RNA samples (see Results).

cDNA-AFLP experiments

For cDNA-AFLP, messenger RNAs were purified from total RNA using the Micropoly(A) Purist kit (Ambion), according to the manufacturer's recommendations.

Procedures for cDNA-AFLP have been described elsewhere (Bachem *et al.* 1996). Briefly, cDNA was synthesized with the Superscript cDNA kit (Invitrogen). cDNA samples were digested with *HindIII/MseI*, restriction fragments were ligated with their corresponding adapters (Semblat *et al.* 2000) and pre-amplification was carried out during 25 cycles (94°C , 30s; 57°C , 45s; 72°C , 60s) using primers without selective nucleotide (H+0: 5' GACTGCGTACCAGCTT 3', M+0: 5' GATGAGTCCTGAGTAA 3'). Then, PCR was performed with a trace amount of [^{32}P]-labelled 5' primer and amplification products were separated on a 5% polyacrylamide gel and analyzed after exposure to X-ray film overnight. Polymorphic fragments were selected when present in the two resistant isolates and absent from the two susceptible isolates, and *vice-versa*.

TDF analysis

Bands of interest were cut from the dried polyacrylamide gel and soaked in 30 μ l sterile water. DNA was recovered after three freeze-thaw cycles using liquid nitrogen. One μ l of the diffusate was used as template for re-amplification using the corresponding primer combination that was used for the cDNA-AFLP experiments. Re-amplification

Table 2. Characteristics of primers used for RT-PCR analysis

Name	Primer	5' Sequence 3'	Amplicon size (bp)
HA1	F	TGA GGT CCT CAA CGA CAG CGA	211
	R	AAC GGC AAA CAA CTG TAC GCT	
HA7	F	TCC GTT CTG GCG TAA GAA TGG	194
	R	TTC GCG AAT TCA ACT CCG GCA	
HA10	F	GAG TTC GGA CAA TTG ATC CCG	370
	R	CAC TGT GGA CCA GTC CGT CGA	
HA17	F	CCT TTT ATT GAA AGC GCA TCG	240
	R	TCT CGT CGA CCA GTG CCA CAG	
HT1	F*	GAA TGC CAG GCG GAA ACA CAA	389
	R	CTG GCC ATT GCG GAT GTC ATC	
HT2	F	CCA CAT GTT TTC GCA CAA TAC	117
	R	AGT GGG CTC GTG GTT CTG CGA	
HT15	F	CCT GAC GGC TCA CCG GAC TGA	171
	R	ACG TAT GAG TAC TGT CCG CGT	
HT23	F	AAC GGG TAT CCG GAA CGG CAA	194
	R	GTG GCT CTC TAC ACA GTG AAC	
β -tubulin	F	CTT TCC GTC CAT CAA CTG GTA	219
	R	TGG AAC CAT GTT CAC GGC TAA C	

* HT1 forward primer was designed in the 5' flanking region of the TDF (*H. contortus* EST Hc_d11_13F08).

products were cloned in the TOPO pCR2.1 vector (Invitrogen) and sequenced by Genome express (Grenoble, France).

Homology searches in databases were performed using the BLAST network service (NCBI, National Center for Biotechnology Information). TDF sequences were compared against all sequences in the non-redundant protein databases using the BLASTX algorithm (Altschul *et al.* 1997). Each TDF sequence was also compared against the EST databases using the BLASTN algorithm.

Semi-quantitative RT-PCR analysis

The primers used for PCR were designed on TDF sequences from the HA1, HA7, HA10, HA17, HT1, HT2, HT15 and HT23 markers (Table 2). RT-PCR experiments were carried out with 500 ng total RNA extracted from adults of all the *H. contortus* isolates. First-strand cDNAs were synthesized with Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Total RNAs were denatured by heating at 65 °C for 5 min and RT was performed at 50 °C for 60 min in a final volume of 20 μ l of the following solution: 0.5 mM dNTPs, 40 U RNase inhibitor, 25 ng/ μ l of T20VN oligonucleotide cocktail (Invitrogen), 5 mM DTT and 200 U Superscript III (Invitrogen).

Semi-quantitative PCRs were then performed in a final volume of 20 μ l containing 1 μ l of 10-fold dilution of reverse transcription reaction products, 250 μ M each dNTP, 25 ng/ μ l each specific primer pair and 1 U GoTaq polymerase (Promega). The reaction mixture was denatured by heating at 94 °C

for 30 sec, annealed at 55 °C for 45 sec, and extended at 72 °C for 45 sec for 33 cycles. The mixture was overlaid with mineral oil and amplified in a MJ Research thermal cycler. The PCR products were subjected to electrophoresis through a 2% agarose gel. Sample normalization was assessed using β -tubulin as the reference transcript.

RESULTS

Detection of differentially expressed genes between LEV-resistant and susceptible isolates of *Haemonchus contortus*

Adult males from two resistant isolates (Kokstad and Cedara) and two susceptible isolates (Moredun and Congo-Zaire) were used in this experiment. Using *HindIII/MseI* as restriction enzymes and 32 primer combinations (Table 2), approximately 4320 transcript-derived fragments (TDFs), ranging from ~100 bp to 850 bp, were generated for each isolate (Fig. 1). Among these TDFs, 26 presented a differential pattern between resistant and susceptible nematodes, i.e. 11 were present in both resistant isolates but were absent from or markedly underexpressed in both susceptible isolates. Conversely, 15 TDFs were present in the susceptible isolates and absent from or underexpressed in the resistant isolates.

Examples of such TDFs are presented in Fig. 1. As a first step, the TDFs specifically detected in resistant isolates were characterized as a matter of priority. To date, 8 have been cloned and sequenced.

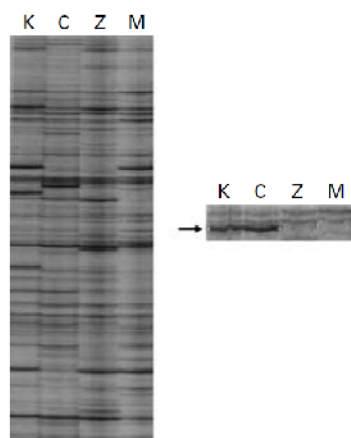


Fig. 1. Example of the transcript derived fragments (TDFs), ranging from ~ 100 bp to 850 bp, generated in the Kokstad, Cedara, Zaire and Moredun isolates (generated using *HindIII/MseI* as restriction enzymes and 32 primer combinations). Among these TDFs, several present a differential pattern between resistant and susceptible nematodes (see on right of the figure).

Hypothetical proteins deduced from the six-frame translated fragments were analysed using the BLASTX program; deduced sequence homologies are presented in Table 3. Four TDF sequences presented significant similarities with hypothetical proteins from *H. contortus*, *C. elegans* or *C. briggsae*, while the other TDFs showed no significant homology with known proteins. Half of these 8 TDFs presented significant similarities with *H. contortus* ESTs. TDFs that did not show any homologies with known genes or ESTs could represent uncharacterized genes, but can also correspond to untranslated regions of mRNA or may be too short to detect significant homologies in databases.

Validation of candidate markers by RT-PCR experiments

To detect polymorphisms of expression between LEV-resistant and susceptible nematodes, RT-PCR experiments were performed on 1st-strand cDNA from *H. contortus* adult males. Primers were designed on the sequences of the 8 TDFs identified in the cDNA-AFLP experiments and RT-PCR analyses were carried out on the Kokstad and Cedara LEV-resistant *vs.* Moredun and Zaire susceptible isolates. Among the 8 TDFs, 7 presented identical expression profiles between resistant and susceptible nematodes (Fig. 2). Conversely, the amplification pattern for HA17 observed during cDNA-AFLP experiments was also obtained through RT-PCR; i.e., we observed an abundant amplicon of the expected size in resistant isolates and a very weak signal in susceptible isolates. This result was confirmed

using a second pair of primers designed in the TDF sequence of HA17 (data not shown).

HA17: a new molecular marker of LEV resistance?

To validate HA17 as a potential LEV resistance marker, a new set of RT-PCR experiments using the primers targeting the TDF HA17 was performed on cDNA from the other resistant and susceptible isolates. The LEV-resistant isolate RHIS6 (selected under controlled conditions starting from the susceptible isolate SHS-Zimbabwe, Hoekstra *et al.* 1997b) and three LEV-susceptible field isolates (Fortaleza (Brazil), Herian (France) and Bordaicoborda (France)) were tested. HA17 expression was readily detected in the three LEV-resistant isolates as shown with an amplification product at the expected size, whereas no or a very low signal was obtained in all susceptible isolates (Fig. 3). As a reference PCR control, we found no change in the expression of the β -tubulin gene. This result clearly suggests that HA17 may be a marker for LEV resistance.

DISCUSSION

In the present study, we describe a cDNA-AFLP strategy comparing transcripts from LEV-resistant and susceptible isolates of *H. contortus* in order to identify resistance markers. The comparative analysis of cDNA from two resistant and two susceptible isolates led to the identification of 26 differentially expressed TDFs. Among these candidates, we focused our attention on 8 TDFs that were specifically present in resistant nematodes, because of their potential utility as resistance markers. However, the 3 remaining TDFs specifically present in resistant isolates, and the 15 TDFs specifically present in susceptible isolates, are currently under investigation. These TDFs might constitute additional LEV resistance markers as well as the TDFs already characterized.

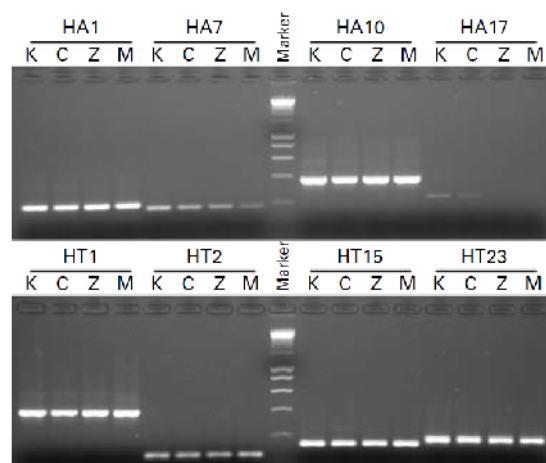
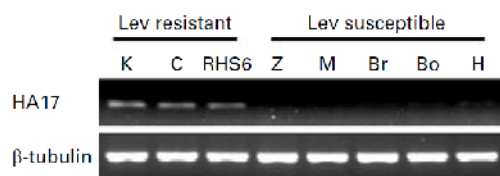
Since a polymorphic pattern observed on cDNA-AFLP gels could result from either quantitative (difference in expression level) or qualitative (transcript polymorphism) differences in mRNAs, RT-PCR experiments were performed to investigate the origin of the polymorphisms observed for the 8 TDFs of interest.

Seven of these TDFs presented a similar expression pattern in resistant and susceptible isolates. For those candidates, further studies will be carried out in order to understand the molecular events underlying the polymorphism detected during cDNA-AFLP analysis. Indeed, polymorphic TDFs observed on cDNA-AFLP gels could also result from mutation in the restriction sites or be related to insertion/deletion events.

In contrast, the HA17 TDF was specifically expressed in the LEV-resistant isolates studied during

Table 3. Summary of 8 TDFs that distinguish levamisole-resistant and sensitive isolates of *Haemonchus contortus*

TDF name	Accession no.	TDF size (bp)	BLASTX		BLASTN			
			Highest homology	E value	EST homology ^a	E value		
HA1	EH380234	288	Hypothetical prot. Hc 42-3	<i>H. contortus</i>	9 e-29	Hc_gut_09D04_skpl	<i>H. contortus</i>	4 e-114
HA7	EH380236	299	No homology	—	—	—	—	—
HA10	EH380241	480	Hypothetical prot. F56F10.1	<i>C. elegans</i>	3 e-41	—	—	—
HA17	EH380240	310	No homology	—	—	—	—	—
HT1	EH380238	250	Hypothetical prot. CBG17511	<i>C. briggsae</i>	6 e-07	Hc_d11_13F08_skpl	<i>H. contortus</i>	7 e-63
HT2	EH380235	143	No homology	—	—	Hc_ad_41G06_skpl	<i>H. contortus</i>	4 e-17
HT15	EH380237	272	Hypothetical prot. CBG03222	<i>C. briggsae</i>	6 e-07	pw03b03.y1	<i>H. contortus</i>	1 e-141
HT23	EH380239	243	No homology	—	—	—	—	—

Fig. 2. RT-PCR analysis of expression levels of eight TDFs in two LEV-resistant (K, C) and two susceptible (Z, M) *H. contortus* isolates. (See Table 1 for isolates code).Fig. 3. Differential expression of the HA17 TDF according to LEV resistance status of *H. contortus* isolates from various geographical locations. HA17 expression was analysed in three LEV-resistant versus five susceptible isolates by semi-quantitative RT-PCR. (See Table 1 for isolates code).

cDNA-AFLP experiments. To validate HA17 as a potential LEV resistance marker, we investigated its expression in additional resistant and susceptible

isolates from different geographical origins. A PCR product was obtained only in LEV-resistant isolates, whereas amplification was not detectable or very weak in susceptible isolates. HA17 can thus be considered as a promising LEV resistance marker, but more field isolates must be tested to estimate its robustness. Even though HA17 sequence presents no homology with known proteins or ESTs, its specific expression in all tested resistant isolates could implicate it in a resistance mechanism. Further characterization of HA17 should include gene cloning, promoter studies and functional validation using the RNA interference technique recently developed for *H. contortus* (Geldhof *et al.* 2006; Kotze and Bagnall, 2006) or transformation of *C. elegans*.

In *H. contortus*, development of LEV resistance appears to be polygenic (Sangster, Davis and Collins, 1991). For that reason, research to discover more resistance markers should be pursued. In this context, the comparative transcriptomic approach described in this paper can be considered as complementary to a candidate gene strategy, based on *C. elegans* data. Indeed, candidate gene strategy has the advantage of concentrating cloning efforts on a limited number of genes in comparison with the numerous candidates generated using the transcriptomic approach described in this paper. However, extrapolation of *C. elegans* data to parasitic nematodes remains hypothetical. In contrast, the cDNA-AFLP approach could lead to the identification of novel genes involved in LEV resistance that are specific to parasitic species. Conversely, it must be recognized that many differential TDFs might represent population markers, which are not linked with the resistance phenotype. Optimally, both approaches should be carried out together. In combination with the anticipated completion of the genome sequence of *H. contortus*, these techniques should accelerate discovery of molecular mechanisms involved in LEV resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the following researchers for providing isolates or strains used in this work: J. Van Wyk, Pretoria University, RSA (Cedara and Kokstad strains) under a French-RSA program; Frank Jackson, Moredun Institute, UK (Moredun strain); Fred Borgsteede, Lelystad Research Institute, NL (RSH6). The Congo Zaire isolate was obtained by one of us (JC) during a World Bank Program/CIRAD with C. Chartier and then maintained in laboratory conditions at INRA Nouzilly. The excellent technical help of Christine Sauvé in preparing isolates from French Basque region and checking for LEV resistance is gratefully acknowledged. C. Neveu is a grateful recipient of a CARS (Consortium for Anthelmintic Resistance SNPs) grant for presenting results in the Glasgow meeting, 4–5 August 2006.

REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389–3402.
- Bachem, C. W. B., van der Hoeven, R. S., de Bruijn, S. M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M. and Visser, R. G. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal* **9**, 745–753.
- Coles, G. C., East, J. M. and Jenkins, S. N. (1975). The mechanism of action of the anthelmintic levamisole. *General Pharmacology* **6**, 309–313.
- Culetto, E., Baylis, H. A., Richmond, J. E., Jones, A. K., Fleming, J. T., Squire, M. D., Lewis, J. A. and Sattelle, D. B. (2004). The *Caenorhabditis elegans unc-63* gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *Journal of Biochemical Chemistry* **279**, 42476–42483.
- Fleming, J. T., Squire, M. D., Barnes, T. M., Tornoe, C., Matsuda, K., Ahnn, J., Fire, A., Sulston, J. E., Barnard, E. A., Sattelle, D. B. and Lewis, J. A. (1997). *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29* and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Journal of Neuroscience* **17**, 5843–5857.
- Geldhof, P., Murray, L., Couthier, A., Gilleard, J. S., McLauchlan, G., Knox, D. P. and Britton, C. (2006). Testing the efficacy of RNA interference in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* **36**, 801–810.
- Hoekstra, R., Borgsteede, F. H. M., Boersema, J. H. and Roos, M. H. (1997b). Selection for high levamisole resistance in *Haemonchus contortus* monitored with an egg-hatch assay. *International Journal for Parasitology* **27**, 1395–1400.
- Hoekstra, R., Visser, A., Wiley, L. J., Weiss, A. S., Sangster, N. C. and Roos, M. H. (1997a). Characterization of an acetylcholine receptor gene of *Haemonchus contortus* in relation to levamisole resistance. *Molecular and Biochemical Parasitology* **84**, 179–187.
- Jones, A. K. and Sattelle, D. B. (2004). Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* **26**, 39–49.
- Kotze, A. C. and Bagnall, N. H. (2006). RNA interference in *Haemonchus contortus*: suppression of beta-tubulin gene expression in L3, L4 and adult worms *in vitro*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **145**, 101–110.
- Lewis, J. A., Wu, C. H., Levine, J. H. and Berg, H. (1980). Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neurosciences* **5**, 967–989.
- Martin, R. J., Verma, S., Levandosky, M., Clark, C. L., Qian, H., Stewart, M. and Robertson, A. P. (2005). Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole. *Parasitology* **131**, S71–S84.
- Neveu, C., Jaubert, S., Abad, P. and Castagnone-Sereno, P. (2003). A set of genes differentially expressed between avirulent and virulent *Meloidogyne incognita* near-isogenic lines encode secreted proteins. *Molecular Plant Microbe Interactions* **16**, 1077–1084.
- Qin, L., Overmars, H., Helder, J., Popcijus, H., Rouppe Van der Voort, J., Groenink, W., Van Koert, P., Schots, A., Bakker, J. and Smant, G. (2000). An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **13**, 830–836.
- Robertson, A. P., Bjorn, H. E. and Martin, R. J. (1999). Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. *FASEB Journal* **13**, 749–760.
- Sangster, N. C., Davis, C. W. and Collins, G. H. (1991). Effects of cholinergic drugs on longitudinal contraction in levamisole-susceptible and levamisole-resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* **21**, 689–695.
- Sangster, N. C., Riley, F. L. and Collins, G. H. (1988). Investigation of the mechanism of levamisole resistance in trichostrongylid nematodes of sheep. *International Journal for Parasitology* **18**, 813–818.
- Sangster, N. C., Riley, F. L. and Wiley, L. J. (1998). Binding of [³H]m-aminolevamisole to receptor in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* **28**, 707–717.
- Sangster, N. C., Song, J. and Demeler, J. (2005). Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. *Parasitology* **131**, S179–S190.
- Semblat, J. P., Bongiovanni, M., Wajsborg, E., Dalmaso, A., Abad, P. and Castagnone-Sereno, P. (2000). Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Heredity* **84**, 81–89.
- Silvestre, A., Chartier, C., Sauvé, C. and Cabaret, J. (2000). Relationship between helminth species diversity, intensity of infection and breeding management in dairy goats. *Veterinary Parasitology* **94**, 91–105.
- Towers, P. R., Edwards, B., Richmond, J. E. and Sattelle, D. B. (2005). The *Caenorhabditis elegans unc-63* gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor α subunit. *Journal of Neurochemistry* **93**, 1–9.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology



Short communication

cDNA-AFLP analysis in levamisole-resistant *Haemonchus contortus* reveals alternative splicing in a nicotinic acetylcholine receptor subunit

Aymeric Fauvin, Claude Charvet, Mohamed Issouf, Jacques Cortet, Jacques Cabaret, Cédric Neveu*

INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2009

Received in revised form

13 November 2009

Accepted 16 November 2009

Available online 22 November 2009

Keywords:

Haemonchus contortus

Levamisole resistance

cDNA-AFLP

Molecular marker

Nicotinic acetylcholine receptor subunit

Parasite nematode

ABSTRACT

The cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism) method comparing transcripts from levamisole-resistant and susceptible *Haemonchus contortus* isolates has led to the successful identification of a number of potentially useful levamisole-resistance markers. In the present study, we report the characterization of the transcript-derived fragment (TDF) named HAX which was confirmed to be specifically expressed in three levamisole-resistant isolates by RT-PCR experiments. Cloning and sequencing of the full-length cDNA sequence of HAX revealed high similarity to the *Caenorhabditis elegans* *acr-8* gene and its putative *H. contortus* orthologue encoding a nicotinic acetylcholine receptor subunit. This *Hco-acr-8b* short isoform corresponded to a spliced variant of *Hco-acr-8* mRNA containing the two first exons and a part of intron 2. As nicotinic acetylcholine receptors constitute the pharmacological target of levamisole, *Hco-acr-8b* may potentially be involved in the molecular mechanisms leading to levamisole-resistance acquisition in *H. contortus*.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Levamisole is a potent anthelmintic widely used to control the gastrointestinal nematodes of domestic livestock. However its efficacy against the parasitic nematode *Haemonchus contortus* has been compromised by the emergence and spread of resistance [1]. In that respect, the identification of the molecular mechanisms of resistance as well as resistance markers will contribute to improve the levamisole treatment management in the field. Levamisole acts on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) present at the nematode neuromuscular junction, resulting in sustained neuromuscular depolarisation and spastic paralysis [2]. Acetylcholine receptors consist of five subunits arranged around a central ion channel [3]. Each subunit possesses an N-terminal extracellular domain containing a disulfide loop followed by four transmembrane regions (TM1–TM4) of which TM2 lines the ion channel [4]. In the free living nematode *Caenorhabditis elegans*, more than 16 genes were found to confer levamisole resistance including three α -subunits (UNC-38, UNC-63, LEV-8) and two non- α -subunits (UNC-29, LEV-1) that assemble to form the functional levamisole-sensitive AChR [5,6]. In parasitic helminths, studies of the mode of action of levamisole, and other cholinergic agonists such as pyrantel, indicate that mechanisms of resistance may involve either a decrease in the number of target nAChRs or mutational changes in

receptors conferring a reduced affinity [7–10]. In *H. contortus*, the sequence analysis of a receptor subunit orthologous to *unc-38* failed to identify any amino acid differences between resistant and susceptible worms [11]. Consequently, the molecular determinants of levamisole resistance in strongyle species remain largely unknown.

The *H. contortus* genome sequencing project completion should allow the rapid identification of orthologues corresponding to *C. elegans* candidate genes. In combination with the candidate gene strategy, global comparative transcriptomic approaches remain useful tools for the identification of novel parasitic genes involved in levamisole resistance. Hence, we have previously initiated a non-hypothesis driven approach in order to identify genes differentially expressed in levamisole-resistant and susceptible isolates of *H. contortus* [12]. This comparative analysis at the transcriptome level was carried out on two levamisole-resistant (Kokstadt and Cedara) and two susceptible (Zaire and Moredun) worm isolates using the cDNA-AFLP (cDNA-amplified fragment length polymorphism) technique [13]. Among more than 17,000 transcript-derived fragments (TDFs) generated, we had identified 26 TDFs displaying a differential expression including 11 TDFs only present in resistant isolates [12]. In the present study, we report the further characterization of the TDF named HAX which shared high similarity to the nAChR α -subunit ACR-8 from *C. elegans* (NM 077344) and its putative orthologue from *H. contortus* (EU006785).

As shown in the cDNA-AFLP autoradiogram gel, HAX was specifically detected in the lev-resistant isolates Kokstadt and Cedara (Fig. 1A). In order to verify the specific expression pattern observed in cDNA-AFLP, semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase

* Corresponding author at: INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, Centre de Recherches de Tours, F-37380 Nouzilly, France. Tel.: +33 2 47427768; fax: +33 2 47427774.

E-mail address: cedric.neveu@tours.inra.fr (C. Neveu).

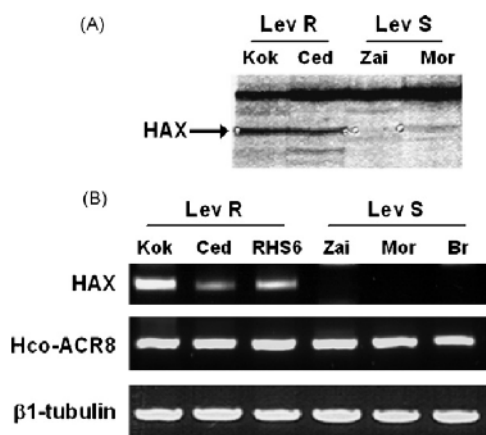


Fig. 1. Visualization of the HAX transcript-derived fragment in the cDNA-AFLP gel autoradiogram (A) and validation by semi-quantitative RT-PCR analysis (B). cDNA-AFLP experiments were performed on purified mRNAs from two lev-resistant isolates (Kokstad and Cedara) and two susceptible isolates (Zaire and More-dun) as described previously [12]. cDNAs were synthesized and digested with HindIII/MseI restriction enzymes and ligated with their corresponding adapters. A pre-amplification of 25 cycles was carried out using primers without extensions. Radioactive PCR were then done with one base extension primers and run on a 5% polyacrylamide gel followed by X-ray film autoradiography. Differentially expressed HAX band was excised from the dehydrated gel. DNA fragments were recovered and used as template for re-amplification, cloning and sequencing. Semi-quantitative RT-PCR with two selective base extension primers allowed specific amplification of HAX in an additional lev-resistant isolate (RHS6) versus three susceptible isolates (Zai, Mor, Brazil). Expression of *Hco-ACR-8* subunit was also investigated. Sample normalization was assessed using isotype 1 β -tubulin transcripts as control.

chain reaction (RT-PCR) experiments were performed with +2 bp selective primers (HAX-H+2 gactcgtaccagcttat and HAX-M+2 gat-gatcctcgagtaaag). As expected, HAX was confirmed to be expressed only in the two lev-resistant isolates previously analyzed in the cDNA-AFLP assay (Fig. 1B). Moreover HAX expression occurred also in the supplementary RHS6-resistant isolate [14] when compared to the three susceptible Zaire, More-dun and Brazil isolates using the isotype 1 β -tubulin transcripts as control (Fig. 1B). Thus, HAX constitutes a new molecular marker associated with the levamisole-resistance phenotype in *H. contortus*.

In order to complete its full-length cDNA sequence, we amplified the 5' and 3' ends of HAX by 5'RACE-PCR (rapid amplification of cDNAs ends) with the SL1 (gggttaattaccaagtttgag) and R-HAX (gcaaagaaglacaaaggtlatct) primers and by 3'RACE-PCR experiments with the HAX-F02 (tttcacaagcaacgctgattac) and 3' nested IN (gaat-laatacactactatagg, sequence homologous to the oligo dT primer used for reverse transcription) primers respectively in the Kok lev-resistant isolate. Both 5' and 3' fragments were cloned in the pGEM-T vector (Promega), sequenced and aligned, resulting in a 614 bp sequence including polyA tail, deposited in Genbank with the accession number GU168769. BLASTN homology searches against the EST databases with the full-length cDNA sequence cor-

responding to HAX and BLASTX against the non-redundant protein databases were then carried out with the NCBI network service [15]. Surprisingly, the 5' part of the HAX shared 94% identities with the first 235 bp of *Hco-acr-8* cDNA sequence (EU006785) and 76% identities on 133 bp of *C. elegans acr-8* cDNA (NM 077344) (Fig. 2). In contrast, the second part of HAX sequence from positions 258 to 614 did not present any significant similarity within the nucleotide databases. Hence, the complete cDNA sequence was named *Hco-acr-8b* in relation with the closest full-length counterpart *Hco-acr-8*. In order to investigate the origin of this 356 bp sequence, the molecular cloning of the *Hco-acr-8* gene DNA sequence was partially achieved in the Kok isolate, using primer pairs designed in the *Hco-acr-8* cDNA sequence (Genbank no. GU168770). Alignment between the *Hco-acr-8* genomic and *Hco-acr-8b* sequences revealed that this short isoform corresponded to an abbreviated spliced variant of *Hco-acr-8* resulting from an intron retention event (Fig. 2). The *Hco-acr-8b* cDNA sequence is composed of exon 1, exon 2 and a part of intron 2 from positions 258 to 596, containing a stop codon and an alternative polyadenylation site in positions 336 and 578, respectively (Fig. 2). The putative protein from *Hco-ACR-8b* sequence contained 87 amino-acids including 61 amino-acids matching 100% to the N-terminal part of *Hco-ACR-8* subunit and 26 amino-acids resulting from deduced translation of the intron 2 portion. Since *Hco-acr-8b* was a short isoform of *Hco-acr-8* mRNA specifically found in lev-resistant isolates, we further investigated the expression of the full-length *Hco-acr-8* in levamisole-resistant versus susceptible isolates using specific primers designed on Genbank EU006785 sequence (*Hco-ACR-8-F1* agcggagaaaagattggratrrtt and *Hco-ACR-8-R1* gagacatactactgcccatt). These RT-PCR experiments revealed that *Hco-acr-8* gene was readily expressed in all isolates and its expression level appeared similar in the lev-resistant isolates when examined using this semi-quantitative technique (Fig. 1B). Therefore, our results demonstrate a co-expression of the alternatively spliced isoform *Hco-acr-8b* along with the full-length mRNA of *Hco-acr-8* in three levamisole-resistant isolates. Interestingly, a truncated variant of the mouse nAChR α 7 subunit has been shown to act as a dominant negative when co-transfected with the full-length subunit in HEK 293 cells [16]. As a first attempt to investigate the role of *Hco-acr-8b* in levamisole-resistance acquisition, a classical strategy would have consisted of transforming a lev-susceptible *H. contortus* with *Hco-acr-8b* and test if resulting transgenic lines would display resistance to levamisole. However, the stable transformation as well as the transient gene silencing that could be performed with the RNA interference technique remains unsuccessful to date in *H. contortus* [17]. In that respect, the recent progress in the reconstitution of the L-AChR of *C. elegans* [6] offers new prospects to validate functional implication of *Hco-ACR-8b* in lev-resistance phenotype. In their elegant experiments, Boulin et al. showed that five nAChR subunits and three ancillary proteins were necessary for the expression of a functional L-AChR in *Xenopus laevis* oocytes. Among these L-AChR subunits, LEV-8 which is closely related to ACR-8 has proven to be important although not essential for the L-AChR constitution [18]. Moreover, recent findings in *C. elegans* suggested that the L-AChR α -subunit UNC-38 may be replaced by the α -subunit ACR-8 in

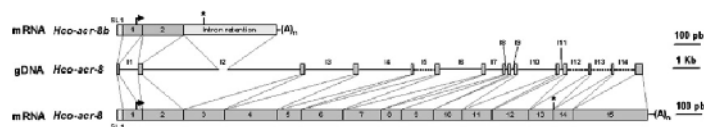


Fig. 2. Schematic representation of reconstituted *Hco-acr-8* gene, the *Hco-acr-8* mRNA and *Hco-acr-8b* transcript based on our nucleotide sequencing data from the Kok lev-resistant isolate and the iSE lev-susceptible sequencing reference isolate. Exons are represented by grey boxes, introns by lines and the unknown intron sequences by dotted lines. Start and stop codons are indicated by an arrow and an asterisk respectively. The spliced leader sequence SL1 is represented by hatch boxes. The intron retention is represented in clear grey, the position of the portion of intron 2 is deduced from the genomic DNA of Kok isolate.

vivo [19,20]. Taking advantage of the anticipated completion of the genome sequence of *H. contortus*, the L-AChR reconstitution will provide an invaluable tool to decipher the exact L-AChR subunit composition and investigate the precise functional role of subunit polymorphisms associated with levamisole resistance.

Acknowledgements

A. Fauvin is a recipient of a PhD grant from “Région Centre” and Animal Health Division of INRA. The *H. contortus* Kokstad, Cedara and RHS6-resistant isolates, and Moredun-susceptible isolate were kindly provided by J.A. Van-Wyk (University of Pretoria, RSA), F. Borgsteede (Lelystad Central Veterinary Institute, NL) and F. Jackson (Moredun Research Institute, UK) respectively. We thank C. Sauvé for valuable technical assistance in preparing isolates and initial checking for levamisole resistance. We wish to acknowledge R. Martin and R. Beech for critical review of the manuscript.

References

- [1] Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* 2004;20:469–76.
- [2] Martin RJ. Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 1997;154:11–34.
- [3] Changeux JP, Benoit P, Bessis A, et al. The acetylcholine receptor: functional architecture and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1990;24:15–9.
- [4] Devillers-Thiery A, Galzi JL, Eisele JL, Bertrand S, Bertrand D, Changeux JP. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels. *J Membr Biol* 1993;136:97–112.
- [5] Jones AK, Buckingham SD, Sattelle DB. Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:321–30.
- [6] Boulton T, Gielen M, Richmond JE, Williams DC, Paoletti P, Bessercrau JL. Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:18590–5.
- [7] Sangster NC, Song J, Demeler J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. *Parasitology* 2005;131(Suppl.):S179–90.
- [8] Robertson AP, Bjorn HE, Martin RJ. Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. *FASEB J* 1999;13:749–60.
- [9] Kopp SR, Coleman CT, Traub RJ, McCarthy JS, Kotze AC. Acetylcholine receptor subunit genes from *Ancylostoma caninum*: altered transcription patterns associated with pyrantel resistance. *Int J Parasitol* 2009;39:435–41.
- [10] Martin RJ, Robertson AP. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology* 2007;134:1093–104.
- [11] Hoekstra R, Visser A, Wiley LJ, Weiss AS, Sangster NC, Roos MH. Characterization of an acetylcholine receptor gene of *Haemonchus contortus* in relation to levamisole resistance. *Mol Biochem Parasitol* 1997;84:179–87.
- [12] Neveu C, Charvet C, Fauvin A, Cortel J, Castagnone-Sereno P, Cabaret J. Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA-AFLP approach. *Parasitology* 2007;134:1105–10.
- [13] Bachem CW, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RC. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* 1996;9:745–53.
- [14] Hoekstra R, Borgsteede FH, Boersema JH, Roos MH. Selection for high levamisole resistance in *Haemonchus contortus* monitored with an egg-hatch assay. *Int J Parasitol* 1997;27:1395–400.
- [15] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [16] Saragoza PA, Modir JC, Goel N, et al. Identification of an alternatively processed nicotinic receptor alpha7 subunit RNA in mouse brain. *Mol Brain Res* 2003;117:15–26.
- [17] Viney ME, Thompson IJ. Two hypotheses to explain why RNA interference does not work in animal parasitic nematodes. *Int J Parasitol* 2008;38:43–7.
- [18] Qian H, Robertson AP, Powell-Coffman JA, Martin RJ. Levamisole resistance resolved at the single-channel level in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 2008;22:3247–54.
- [19] Gottschalk A, Almedom RB, Schedletzky T, Anderson SD, Yates 3rd JR, Schaefer WR. Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 2005;24:2566–78.
- [20] Almedom RB, Liewald JF, Hernandez G, et al. An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse. *EMBO J* 2009;28:2636–49.

Tableau IX : Description des différents TDFs identifiés au cours de l'approche de cDNA-AFLP

TDF	Taille (pb)	Phénotype	BLAST X	Espèce	E-value	% de similarité protéique
HA1	288	R	Putative protein hc42.3	<i>Haemonchus contortus</i>	5 e-29	85
HA7	299	R	Pas d'homologie	/	/	/
HA10	480	R	Intestinal prolyl carboxypeptidase 1	<i>Haemonchus contortus</i>	5 e-46	70
HA17	310	R	Pas d'homologie	/	/	/
HAX	304	R	Nicotinic acetylcholine receptor 8	<i>Haemonchus contortus</i>	3 e-28	100
HT1	250	R	CBR-CLC-1 (Claudin Like in <i>Caenorhabditis</i>)	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	2 e-08	77
HT2	143	R	Pas d'homologie	/	/	/
HT15	272	R	Translocation protein 1	<i>Loa loa</i>	1 e-09	100
HT23	243	R	Pas d'homologie	/	/	/
HC1	336	R	VAB-10A (Variable AB normal morphology)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	3 e-40	86
HG7	550	R	NIM-2	<i>Haemonchus contortus</i>	3 e-92	98
HA4	385	S	CRE-TWK-24 (TWiK family of potassium channels)	<i>Caenorhabditis remanei</i>	2 e-32	90
HA5	144	S	Pas d'homologie	/	/	/
HA6	145	S	Pas d'homologie	/	/	/
HA8	256	S	Hypothetical protein LOAG_02464	<i>Loa loa</i>	1 e-06	94
HA11	567	S	Hypothetical protein CRE_00693	<i>Caenorhabditis remanei</i>	1 e-31	58
HA12	497	S	DHC-1 (Dy nein H eavy C hain)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	4 e -76	93
HA13	283	S	Hypothetical protein CBG02349	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	6 e -34	99
HT3	512	S	CRE-RPL-7A (R ibosomal P rotein, L arge subunit)	<i>Caenorhabditis remanei</i>	3 e -54	91
HT4	536	S	Microsomal aminopeptidase	<i>Haemonchus contortus</i>	2 e-85	98
HT7	129	S	Pas d'homologie	/	/	/
HT8	393	S	CBR-TTR-33 (T rans T hyretin- R elated family domain)	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	8 e-15	57
HT9	390	S	Hypothetical protein CBG_16611	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	5 e-28	76
HT19	811	S	Cathepsin B-like cysteine protease GCP7	<i>Haemonchus contortus</i>	1 e-156	100
HC8	270	S	CRE-XRN-1 (eXoRiboN uclease)	<i>Caenorhabditis remanei</i>	4 e -35	90
HC10	228	S	CBR-UBQ-1 (UBiQ uitin)	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	6 e-26	100

Résultats / Discussion des articles 2 et 3

Les analyses transcriptomiques comparatives d'isolats résistants *versus* sensibles au lévamisole a permis d'identifier approximativement 17 280 fragments de transcrits (TDFs) parmi lesquels 26 présentent un profil d'expression différent entre les 2 isolats résistants au lévamisole et les 2 isolats sensibles. Onze sont spécifiquement exprimés chez les 2 isolats résistants au lévamisole et 15 chez les 2 isolats sensibles. Pour chaque candidat le TDF à été séquencé et l'expression différentielle de ces TDFs identifiée en cDNA-AFLP a été vérifiée par des expériences de PCR semi-quantitative. Le nom, la taille ainsi que la meilleure homologie en BLASTX de chaque TDF sont récapitulés tableau IX.

Parmi les 26 TDFs isolés, 2 ont montré un profil d'expression différentiel similaire entre le cDNA-AFLP et les PCR semi-quantitative de contrôle :

1) Le premier TDF : HA17 a été retrouvé exprimé spécifiquement chez les 2 isolats résistants. L'expression différentielle de ce marqueur de résistance au lévamisole potentiel a été validée sur 4 nouveaux isolats. Une souche résistante au lévamisole sélectionnée artificiellement en laboratoire à partir d'une souche sensible du Zimbabwe (RHS6) (Hoekstra *et al.*, 1997a) et sur 3 souches sensibles : Brésil, Bordaicoborda et Herian provenant respectivement de la ville de Fortaleza au Brésil et de 2 élevages du pays basque pour les 2 dernières.

Ce TDF ne présente aucune homologie avec les séquences nucléotidiques ou protéiques répertoriées dans les bases de données. Ce résultat peut signifier que le gène *hal7* est spécifique à l'espèce *H. contortus* ou bien que le TDF correspond à une partie de l'ADNc non retrouvée chez les autres espèces (parties non codantes ou non conservées du gène). L'ADNc complet du gène *hal7* n'a pour l'heure pas été entièrement cloné. Etant donné qu'aucun cadre de lecture ouvert n'est présent au sein de la séquence de 310 paires de bases du TDF, il est possible que ce TDF corresponde à la fin de l'ADNc et donc au 3'UTR de la séquence. La séquence 3' UTR d'un gène étant une séquence qui participe à la régulation du gène, elle est très variable entre espèces même si le gène est quand à lui très conservé. Les données disponibles actuellement sur le génome d'*H. contortus* ne nous permettent pas de progresser sur ce point.

La séquence complète du gène *hal7* et donc l'ADNc et la fonction de la protéine correspondante restent donc à déterminer.

2) Le profil d'expression du second TDF HAX a été testé sur 3 isolats résistants au lévamisole (Kokstad, Cedara & RHS6) ainsi que sur 3 isolats sensibles (Zaire, Brésil & Moredun). Ces expériences montrent bien l'expression d'HAX uniquement chez les isolats résistants au lévamisole. HAX présentait des homologies avec la sous-unité d'AChR ACR-8 de *Caenorhabditis elegans*. Ce résultat est particulièrement intéressant car la cible du lévamisole est un sous-type particulier d'AChR. Cependant chez *C. elegans* la composition du récepteur au lévamisole a été clairement identifiée et décrite comme formée de 5 sous-unités différentes. La sous-unité ACR-8 ne participe pas à la constitution du L-AChR et des études montrent qu'elle participerait à un récepteur insensible au lévamisole (Touroutine *et al.*, 2005). Néanmoins, des études plus récentes ont montré que la sous-unité ACR-8 peut interagir avec la sous-unité UNC-29 qui elle a été décrite comme essentielle au récepteur au lévamisole chez ce nématode (Gottschalk *et al.*, 2005).

Suite à l'identification de ce TDF, le clonage et l'analyse de la forme pleine longueur d'*Hco-acr-8* chez les différents isolats testés en cDNA-AFLP n'a pas permis de mettre en évidence de polymorphisme associé à la résistance au lévamisole, que ce soit au niveau de la séquence nucléotidique ou au niveau de l'expression de la forme pleine longueur.

L'ADNc complet du gène correspondant au TDF HAX correspond à une isoforme du gène *Hco-acr-8*. Cette isoforme (nommée *Hco-acr-8b* selon la nomenclature décrite dans (Beech *et al.*, 2010b)) correspond aux 2 premiers exons du gène *Hco-acr-8*, ainsi qu'à une partie d'environ 350 paires de bases correspondant à une portion de l'intron 2. Ce phénomène d'épissage alternatif fait apparaître un codon stop et un site de polyadénylation alternatif. Le rôle de cette protéine dans un éventuel mécanisme de résistance au lévamisole reste à déterminer.

Dans le but de savoir si le transcrit du gène *Hco-acr-8b* est traduit en protéine des études de western blot complémentaires seront nécessaires. En effet la production par les cellules de formes aberrantes d'ARNm est un phénomène courant et la majorité des ADNc qui possèdent un codon stop prématuré est dégradée par un mécanisme de régulation cellulaire appelé NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay).

La recherche de gènes potentiellement impliqués dans la résistance au lévamisole par une technique de cDNA-AFLP nous a donc permis d'identifier 2 ARNm spécifiquement exprimés chez nos isolats résistants au lévamisole et absents chez nos isolats sensibles. La validation de

cette différence d'expression à l'aide d'isolats supplémentaires confirme l'intérêt de ces 2 candidats en tant que marqueurs de résistance. Cependant l'implication potentielle de ces 2 gènes dans un éventuel mécanisme de résistance au lévamisole reste encore à étudier.

ARTICLE 4

Introduction de l'article 4

En 1982, des études montrent que l'œuf de xénope est un système performant pour l'expression et les études d'électrophysiologie de récepteurs canaux (Miledi *et al.*, 1982). Ce système d'expression permet notamment d'analyser les propriétés pharmacologiques et physicochimiques d'un récepteur, il peut également permettre d'étudier *in vitro* l'effet de mutations ou la présence de formes tronquées sur le fonctionnement du récepteur (pour revue (Bianchi & Driscoll, 2006)). En 2008, Thomas Boulin réalise la première expression fonctionnelle du L-AChR de *Caenorhabditis elegans* en œufs de xénope (Boulin *et al.*, 2008). Ce travail a ouvert la voie pour la reconstitution du récepteur au lévamisole chez d'autres nématodes et notamment les espèces parasites.

Les résultats issus des approches gènes-candidats et transcriptomique nous ont permis de cloner les homologues des sous-unités du L-AChR de *C. elegans* chez le strongle digestif *Haemonchus contortus* et de détecter une sous-unité d'AChR non associée avec le L-AChR de *C. elegans*. Ces résultats permettent de reconstituer *in vitro* le L-AChR d'un strongle digestif (*H. contortus*) avec pour objectif d'identifier les sous-unités qui participent au L-AChR, ainsi que d'étudier d'un point de vue mécanistique l'implication potentielle de la forme tronquée *Hco-unc-63b* dans le phénotype de résistance au lévamisole.

Chez *C. elegans* la reconstitution du récepteur nécessite la présence de trois protéines accessoires nécessaires pour exprimer le L-AChR (RIC-3, UNC-50 & UNC-74). Nous avons recherché les homologues de ces protéines accessoires afin de tester leur implication potentielle dans l'expression *in vitro* du L-AChR d'*H. contortus*.

L'ensemble des résultats est présenté dans l'article suivant :

Fauvin A, Boulin T, Charvet CL, Cortet J, Cabaret J, Bessereau JL & Neveu C (2011). Functional reconstitution of *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. *British Journal of Pharmacology* (10.1111/j.1476-5381.2011.01420.x).

Functional Reconstitution of *Haemonchus contortus* Acetylcholine Receptors in *Xenopus* Oocytes Provides Mechanistic Insights into Levamisole Resistance

Running title: Expression of *H. contortus* AChR in *Xenopus* Oocytes

T Boulin^{1,2,3,*}, A Fauvin^{4,*}, CL Charvet⁴, J Cortet⁴, J Cabaret⁴, J-L Bessereau^{1,2,3} and C Neveu⁴.

¹ Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, Biology Department, F-75005 Paris, France.

² INSERM, U1024, F-75005 Paris, France.

³ Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8197, F-75005 Paris, France.

⁴ INRA, UR1282 Infectiologie Animale et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France.

* T Boulin and A Fauvin contributed equally.

Abbreviations

ACh, acetylcholine; AVM, avermectins; BZ, benzimidazoles; DH E, dihydro-erythroidine; DMPP, 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium; dTC, (+)-tubocurarine; Hco-L-AChR1, *H. contortus*-levamisole-sensitive acetylcholine receptor 1; Hco-L-AChR2, *H. contortus*-

Corresponding authors:

Thomas Boulin
Ecole Normale Supérieure,
IBENS, INSERM U1024, CNRS
UMR 8197, 46, rue d'Ulm, 75005 Paris.
E-mail: boulin@biologie.ens.fr
Telephone: + 33 1 44 32 23 09
Fax: + 33 1 44 32 36 54

Cédric Neveu
INRA-Centre de recherche
de Tours, UR-1282, IASP213
37300 Nouzilly
E-mail: cedric.neveu@tours.inra.fr
Telephone: + 33 2 47 42 76 74
Fax: + 33 2 47 42 77 74

levamisole-sensitive acetylcholine receptor 2; L-AChR, levamisole-sensitive acetylcholine receptor; Lev, levamisole; N-AChR, nicotine-sensitive acetylcholine receptor; Nic, nicotine; Pyr, pyrantel.

SUMMARY

BACKGROUND AND PURPOSE

The cholinergic agonist levamisole is widely used to treat parasitic nematode infestations. This anthelmintic drug paralyzes worms by activating a class of levamisole-sensitive acetylcholine receptors (L-AChRs) expressed in nematode muscle cells. However, levamisole efficacy has been compromised by the emergence of drug resistant parasites, especially in gastrointestinal nematodes such as *Haemonchus contortus*. We report here the first functional reconstitution and pharmacological characterization of *H. contortus* L-AChRs in a heterologous expression system.

EXPERIMENTAL APPROACH

In the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, five AChR subunit and three ancillary protein genes are necessary *in vivo* and *in vitro* to synthesize L-AChRs. We have cloned the *H. contortus* orthologs of these genes and expressed them in *Xenopus* oocytes. We reconstituted two types of *H. contortus* L-AChRs with distinct pharmacologies by combining different receptor subunits.

KEY RESULTS

We show that the Hco-ACR-8 subunit plays a pivotal role in the selective sensitivity to levamisole. Similar to *C. elegans* L-AChRs, expression of *H. contortus* receptors requires the ancillary proteins Hco-RIC-3, Hco-UNC-50 and Hco-UNC-74. Using this experimental system we could demonstrate that a truncated Hco-UNC-63 L-AChR subunit, which was specifically detected in a levamisole-resistant *H. contortus* isolate but not in levamisole-sensitive strains, hampers the normal function of L-AChRs when co-expressed with its full-length counterpart.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

We provide the first functional evidence for a putative molecular mechanism involved in levamisole resistance in any parasitic nematode. This expression system will provide a means to analyze molecular polymorphisms associated with drug resistance at the electrophysiological level.

Keywords

Recombinant receptor expression, acetylcholine receptor, nematode, anthelmintic drug, drug resistance, *Haemonchus contortus*.

Introduction

Gastrointestinal parasite infections are of major importance for human health and animal welfare. In the absence of effective vaccination strategies, control of parasitic helminths relies mainly on the use of broad spectrum anthelmintics such as levamisole (Lev), benzimidazoles (BZ) and avermectins (AVM). Intensive use of these drugs has inevitably led to the selection of resistant parasites. For example, the haematophagous parasite *Haemonchus contortus* (barber pole worm) is one of the most prevalent and pathogenic trichostrongylid species affecting small ruminants and threatening productivity and profitability in sheep and goat farming worldwide (Kaplan, 2004; Waller *et al.*, 2005). *H. contortus* populations resistant to these three classes of anthelmintics and even combinations of drugs have been reported around the world (Kaplan, 2004). However, the rate of resistance selection for levamisole appears to be slower in *H. contortus* in comparison with BZ and AVM. Therefore levamisole remains a useful tool to control BZ and AVM resistant parasites populations (Tyrrell *et al.*, 2010).

Levamisole and other cholinergic agonists such as pyrantel and oxantel activate AChRs expressed in nematode body-wall muscles (Aceves *et al.*, 1970; Aubry *et al.*, 1970; Colquhoun *et al.*, 1991; Harrow *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 2004). Exposure to these drugs causes spastic paralysis of the worms, which are either killed as for the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* or expelled from the host organism in the case of *H. contortus*. The molecular composition of levamisole-sensitive AChRs (L-AChRs) was first deciphered in *C. elegans* using the powerful genetic tools available in this model organism (Lewis *et al.*, 1987; Lewis *et al.*, 1980). Forward genetic screens for levamisole-resistant mutants in *C. elegans* identified the five genes encoding the five subunits of L-AChRs. They include three α -subunits (UNC-63, UNC-38, LEV-8) and two non- α -subunits (UNC-29, LEV-1) (Boulin *et al.*, 2008; Culetto *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 1997; Towers *et al.*, 2005). In

addition, mutation of three additional genes, *ric-3*, *unc-74* and *unc-50*, causes a complete loss of L-AChR expression in muscle cells. RIC-3 is a small transmembrane protein thought to act as a chaperone promoting AChR folding in the endoplasmic reticulum (Millar, 2008). It is involved in the assembly or maturation of at least four distinct AChRs in *C. elegans*, including levamisole- and nicotine-sensitive AChRs in muscle (Halevi *et al.*, 2002; Halevi, *et al.*, 2003). *unc-74* encodes a thioredoxin closely related to the human TMX3 protein (Haugstetter *et al.*, 2005). It is likely required for the proper folding of L-AChR subunits although its function has not been characterized in detail so far. *unc-50* encodes a transmembrane protein mostly localized to the Golgi apparatus. In *unc-50* mutants, L-AChRs, but no other ionotropic receptors, are targeted to lysosomes for degradation, suggesting a specific role for this protein in the regulation of L-AChR trafficking (Eimer *et al.*, 2007). These three genes have been widely conserved through evolution from nematodes to humans.

In the absence of an efficient expression system for nematode L-AChRs, the biophysical and pharmacological characterization of these receptors has relied for almost four decades on *in vivo* electrophysiological analysis, conducted initially in *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum* (Qian *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 1999) and subsequently in *C. elegans* (Qian *et al.*, 2008; Richmond *et al.*, 1999). Recently, we have obtained robust expression of *C. elegans* L-AChRs in *Xenopus* oocytes by providing cRNAs not only encoding the five L-AChR subunits but also the three ancillary proteins RIC-3, UNC-50 and UNC-74 (Boulin *et al.*, 2008). Interestingly, the sole expression of the *A. suum* orthologs of *unc-29* and *unc-38* in *Xenopus* oocytes was sufficient to reconstitute AChRs with varying sensitivity to levamisole and nicotine depending on the relative expression levels of the two subunits (Williamson *et al.*, 2009). Since *A. suum* is evolutionary distant from *C. elegans*, these results suggested that the molecular composition of L- and N-AChRs could vary among

nematodes, although the potential contribution of additional subunits in the formation of AChRs and the role of ancillary proteins for AChR expression was not explored in this study.

H. contortus and *C. elegans* belong to the same phylogenetic group (clade V), which also includes the human parasites *Ancylostoma ceylanicum* and *Necator americanus* (Mitreva *et al.*, 2004). The precise molecular mechanisms involved in levamisole resistance are still poorly understood in trichostrongylid nematodes, but L-AChR subunit genes are obvious candidates based on results obtained in *C. elegans*. The orthologs of *unc-29*, *unc-63*, *unc-38* and *lev-1* have been cloned in *H. contortus* and other parasitic trichostrongylid species such as *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* (Hoekstra *et al.*, 1997; Neveu *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2001; Wiley *et al.*, 1996). No clear ortholog of the *C. elegans* LEV-8 L-AChR subunit has been found (Neveu *et al.*, 2010; Williamson *et al.*, 2007) but a transcriptomic study carried out in *H. contortus* has recently identified another AChR subunit, Hco-ACR-8, as a candidate gene implicated in levamisole resistance (Fauvin *et al.*, 2010). Hco-ACR-8 is most closely related to the *C. elegans* LEV-8 and ACR-8 receptor subunits. A comprehensive analysis performed on the laboratory-selected RHS6 levamisole-resistant isolate identified a truncated isoform of *Hco-unc-63* (*Hco-unc-63b*), which was co-expressed with the full-length *Hco-unc-63a* transcript (Neveu *et al.*, 2010). Truncated *unc-63* transcripts were also identified in levamisole-resistant field isolates of the trichostrongylid species *T. circumcincta* and *T. colubriformis*, suggesting a possible link between variants of the *unc-63* locus and levamisole resistance phenotypes (Neveu *et al.*, 2010). Yet, this hypothesis could not be tested because of the lack of an heterologous expression system.

In the present study, we demonstrate that two levamisole-sensitive AChRs of *H. contortus* can be functionally reconstituted in *Xenopus* oocytes by co-expressing receptor subunits and conserved ancillary factors. We use this novel expression system to characterize these L-AChRs. Finally, we show that a truncated AChR subunit found in levamisole-

resistant isolates has a dominant-negative effect on the expression of wild-type *H. contortus* receptors in *Xenopus* oocytes. This result suggests a novel mechanism by which levamisole resistance can be obtained in trichostrongylid parasites. It further indicates the capability of this novel expression system to test the functional relevance of polymorphisms associated with resistance to levamisole in wild isolates.

Methods

Ethics statement

All animals used for parasite production were handled in strict accordance with guidelines of good animal practice defined by the Center France-Limousin ethical committee (France). Sheep studies were performed under experimental agreement 6623 approved by the Veterinary Services (Direction des Services vétérinaires) from Indre et Loire (France).

Accession numbers

The accession numbers for protein and cDNA sequences mentioned in this article are:

C. elegans: ACR-2 NM_076727, ACR-3 NM_076728, ACR-8 - JF416644, ACR-12 NM_077861, LEV-1 NP_502534, LEV-8 NP_509932, RIC-3 NP_501299, UNC-29 NP_492399, UNC-38 NP_491472, UNC-50 NP_499279, UNC-63 NP_491533 and UNC-74 NP_491361; *H. contortus*: *Hco-acr-8* EU006785, *Hco-lev-1* GU060987, *Hco-ric-3.1* HQ116823, *Hco-ric-3.2* HQ116824, *Hco-unc-29.1* GU060980, *Hco-unc-38* GU060984, *Hco-unc-50* HQ116822, *Hco-unc-63a* GU060985, *Hco-unc-63b* GU060986, *Hco-unc-74* HQ116821; *T. circumcincta*: *Tci-acr-8* HQ215517; *T. colubriformis*: *Tco-acr-8* HQ215518.

Nematodes isolates

Experiments with *H. contortus* were performed on the levamisole-susceptible ISE (Roos *et al.*, 2004) and the levamisole-resistant RHS6 isolates (Hoekstra *et al.*, 1997). Adult nematodes (males and females) were collected 30 days after infection from the abomasal mucosa of sheep infected with 10,000 infective larvae (L3s). The *T. circumcincta* and *T. colubriformis* studies were carried out on the levamisole-susceptible TciSO and TcoSO isolates respectively (Neveu *et al.*, 2010). For these species, sheep were experimentally infected with 5000 infective larvae (L3s) and adult nematodes (males) were collected from the abomasum

(*T. circumcincta*) or the small intestine (*T. colubriformis*) 30 days after infection. The levamisole susceptibility or resistance status of all isolates used in this study has been confirmed previously (Neveu *et al.*, 2010).

Molecular biology

Total RNA was prepared from ten adult males from *H. contortus* ISE and RHS6 isolates, and from 50 adult males of *T. circumcincta* (TciSO) or *T. colubriformis* (TcoSO). Frozen worms were homogenised in Trizol reagent (Invitrogen) and total RNA was isolated according to the manufacturer's recommendations. RNA pellets were dissolved in 25 µl of RNA secure resuspension solution (Ambion) and DNase-treated using the TURBO DNA-free kit (Ambion). RNA concentrations were measured using a nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific). First strand cDNA synthesis was performed on 3 µg of total RNA using the oligo (dT) RACER primer and superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). Full-length cDNA sequences homologous to *Cel-acr-8*, *Cel-ric-3*, *Cel-unc-50* and *Cel-unc-74* were identified in *H. contortus* (ISE) using first strand cDNA as a template. 3' cDNA ends were identified by 3' RACE PCR using the GeneRacer kit (Invitrogen) with primers based on partial genomic sequences available in the *H. contortus* genome sequence database (www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/h_contortus). The 5' end of each cDNA was amplified by using the nematode spliced-leader sequence SL1 (gggttaattaccaagtttgag). Amplification products were cloned in pGEMt-easy vector (Promega) and fully sequenced. Full-length cDNA sequences homologous to *Hco-* and *Cel-acr-8* were identified in *T. circumcincta* (TciSO) and *T. colubriformis* (TcoSO) using similar cloning strategies. 3'-RACE and SL1-PCR experiments were carried out using degenerate primers based on an alignment of *H. contortus* and *C. elegans acr-8* cDNA sequences. The full length cDNAs coding for *Hco-acr-8*, *Hco-lev-1*, *Hco-ric-3.1*, *Hco-ric-3.2*, *Hco-unc-29.1*, *Hco-unc-38*, *Hco-unc-50*, *Hco-unc-63a* and

Hco-unc-74 were amplified by PCR using first strand cDNA from the *H. contortus* ISE isolate, whereas *Hco-unc-63b* was amplified using cDNA from the RHS6 isolate. Next, amplification products were gel purified, and digested with XhoI and ApaI (HindIII and ApaI for *Hco-unc-29.1*) and cloned into the pTB207 expression vector (Boulin *et al.*, 2008). Each construct was validated by sequencing. Finally, cRNA was synthesized *in vitro* from linearized plasmid DNA templates using the mMessage mMachinE T7 transcription kit (Ambion). Lithium chloride-precipitated cRNA was resuspended in RNase-free water and stored at -80 °C. All primer sequences are reported in Supplementary Table S1 and S2.

Sequence analysis

Database searches were performed with the BLAST Network Service (NCBI), using the tBLASTn or BLASTX algorithms (Altschul *et al.*, 1997). Signal peptide predictions were carried out using the the SignalP 3.0 server (Bendtsen *et al.*, 2004) and membrane-spanning regions were predicted using TMPred. Coiled-coil motifs were predicted using the coiled-coil prediction program (www.russell.embl.de/cgi-bin/coils-svr.pl) and conserved protein domains were predicted using SMART (Schultz *et al.*, 1998). Phylogenetic analyses were performed on full-length cDNA sequences as follow: the nucleotide sequences were first translated and amino acid sequences aligned using MUSCLE (Edgar, 2004). The corresponding nucleotide alignment was obtained by concatenating codons using the REVTRANS server. The alignment was analyzed using the pipelines available on the phylogeny.fr and the alignment refinement was performed using Gblocks (Castresana, 2000). The Maximum-likelihood (ML) tree was estimated using PhyML taking into account the best-fitting nucleotide substitution model (General Time Reversible) using the Datamonkey server. The statistical support of the inferred tree was evaluated by non-parametric bootstrap analysis with one thousand pseudoreplicates.

Reagents

Acetylcholine chloride (ACh), BAPTA-AM, Dihydro- β -erythroidine hydrobromide (DH β E), 1,1-Dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide (DMPP), (-)-tetramisole hydrochloride (levamisole, Lev), (-)-nicotine hydrogen tartrate (Nic), pyrantel citrate (Pyr), (+)-Tubocurarine chloride hydrate (dTC) were purchased from Sigma-Aldrich.

Electrophysiological studies in *Xenopus laevis* oocytes

Xenopus laevis oocytes were prepared, injected, voltage-clamped, and superfused as described previously (Paoletti *et al.*, 1995) except that gentamycin was omitted from the conservation medium because prolonged treatments with this antibiotic can inhibit AChRs expressed in *Xenopus* oocytes (Amici *et al.*, 2005). For each oocyte, ~36 nL of a cRNA injection mix containing 50 ng/ μ L of each cRNA species were injected into the animal pole. Oocytes were recorded two to three days after injection. Unless otherwise noted, the standard external solution had the following composition (in mM): 100 NaCl, 2.5 KCl, 1 CaCl₂ and 5 HEPES; pH 7.3 (NaOH). In some experiments (dose-response experiments, agonist and antagonist pharmacology) the calcium chelator BAPTA was loaded into oocytes to prevent activation of endogenous calcium-activated chloride conductances. BAPTA-AM (Sigma) was diluted in Barth medium (100 μ M final concentration) and oocytes were incubated for ~4 h in 200 μ L BAPTA-AM solution at 19°C. Data were collected and analyzed using Clampex 9.2 and Clampfit 9.2 (Axon Instruments). Data were fitted using KaleidaGraph 4.0 (Synergy Software). Error bars represent one standard deviation. Dose-response curves were established as described previously (Boulin *et al.*, 2008).

Results

The *trichostrongylid* ACR-8 subunit might be distantly related to *C. elegans* LEV-8

Based on genetic, biochemical and electrophysiological data (Boulin *et al.*, 2008; Gottschalk *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 1987; Richmond *et al.*, 1999), *C. elegans* levamisole-sensitive AChR are composed of five receptor subunits (*Cel-lev-1*, *Cel-lev-8*, *Cel-unc-29*, *Cel-unc-38* and *Ce-unc-63*). Clearly identifiable orthologs for four of these subunits have been found in the trichostrongylids *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*. Trichostrongylid L-AChR subunits are highly similar to their *C. elegans* counterparts, with a few notable differences. First, while *C. elegans* has only a single locus encoding a UNC-29 subunit, *H. contortus* has four paralogs named *Hco-unc-29.1*, *Hco-unc-29.2*, *Hco-unc-29.3*, *Hco-unc-29.4* (Neveu *et al.*, 2010). Of these four subunits, Hco-UNC-29.1 is the most similar to UNC-29 (79 % identity, 88 % amino-acid similarity). Second, no signal peptide is readily identifiable in any trichostrongylid LEV-1 subunit (Neveu *et al.*, 2010). Third, no clear homolog of *Cel-lev-8* has been found so far using bioinformatic or experimental approaches. The closest homolog of *Cel-lev-8* in trichostrongylids is the AChR subunit ACR-8.

Using a PCR-based strategy, we have cloned the full-length *acr-8* cDNA sequences from three levamisole-sensitive trichostrongylid nematodes (*H. contortus* ISE isolate, *T. circumcincta* TciSO isolate, *T. colubriformis* TcoSO isolate). The *acr-8* orthologs identified in *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*, have been designated *Hco-acr-8*, *Tc—acr-8* and *Tco-acr-8*, respectively, following recent nomenclature recommendation (Beech *et al.*, 2010). The trichostrongylid ACR-8 sequences contain the typical features of an AChR subunit. All three subunits possess a YxxCC motif in loop C of the ACh-binding site defining them as subunits (Figure 1B). Even though trichostrongylid ACR-8 sequences are mostly similar to *Cel-ACR-8* (percentage identities ranging from 68 to 69 %), they also share common amino-acid signatures with the *Cel-LEV-8* sequence, which are absent in *Cel-ACR-*

8 (residues labeled in red in Figure 1B). Interestingly, these conserved amino-acids are mostly located between the cys-loop and the first transmembrane region, which corresponds to the agonist binding site region of AChR subunits. In *C. elegans* UNC-29 can interact with the ACR-8 subunit in addition to the L-AChR subunits previously known to contribute to levamisole receptors (Gottschalk *et al.*, 2005). Although *acr-8* mutants are not resistant to levamisole, ACR-8 could replace another subunit in the *C. elegans* L-AChR (Almedom *et al.*, 2009). Taken together these results suggested that Hco-ACR-8 could be involved in the *H. contortus* L-AChR subunit composition in the absence of a trichostrongylid LEV-8 homolog.

Ancillary factors required for L-AChR expression in *C. elegans* are conserved in *H. contortus*

We previously demonstrated that three ancillary proteins encoded by *ric-3*, *unc-50* and *unc-74* are required for the robust expression of *C. elegans* L-AChRs in *Xenopus* oocytes (Boulin *et al.*, 2008). We hypothesized that these ancillary proteins could also be necessary for heterologous expression of *H. contortus* L-AChRs.

After identifying likely candidates by performing BLAST searches on the *H. contortus* genome, we isolated the corresponding full-length cDNA sequences for *Hco-unc-50*, *Hco-unc-74* and two *ric-3* orthologs *Hco-ric-3.1* and *Hco-ric-3.2*. The *H. contortus* and *C. elegans* orthologs share typical sequence features (Table 1 and Supplementary Figure S1). Hco-UNC-50 harbours a UNC-50 domain and five predicted transmembrane regions that are characteristic of Cel-UNC-50 (Eimer *et al.*, 2007). Hco-UNC-74 contains a predicted signal peptide, a thioredoxin domain and a predicted transmembrane region in its C terminal part. The two *H. contortus* RIC-3 proteins have two transmembrane regions and C-terminal coiled-coil motifs. They only differ by seven amino-acid substitutions that do not affect

transmembrane region and coiled-coil motif predictions. The corresponding genes mapped unambiguously to two distinct supercontigs (0006784 and 0043984) suggesting a recent duplication of the gene in *H. contortus*. Interestingly, partial coding sequences sharing significant similarity with each of the *C. elegans* and *H. contortus* ancillary factors can be easily identified in *Brugia malayi* and *Ascaris suum* genomic databanks (Supplementary Figure S1). This suggests that ancillary proteins are conserved among nematodes distantly related to *C. elegans*.

Reconstitution of *H. contortus* levamisole-sensitive AChRs in *Xenopus laevis* oocytes

Our strategy to express *H. contortus* L-AChRs was based on the previous reconstitution of *C. elegans* L-AChRs in (Boulin *et al.*, 2008; Jospin *et al.*, 2009). We coinjected *in vitro* transcribed cRNAs of the four AChR subunits *Hco-acr-8*, *Hco-unc-29.1*, *Hco-unc-38* and *Hco-unc-63a* with cRNAs encoding three conserved ancillary factors *Hco-ric-3.1*, *Hco-unc-50* and *Hco-unc-74* (Figure 2). This combination of cRNAs led to the robust expression of levamisole-sensitive AChRs two to three days after injection. Application of 100 μ M acetylcholine or 100 μ M levamisole elicited rapidly increasing currents in the μ A range with little to no desensitization (Figure 3A). Addition of the *Hco-lev-1* subunit did not result in any detectable change in expression suggesting that this subunit is not required for the functional expression of the receptor (data not shown). This result is consistent with the absence of predicted signal peptides in any of the trichostrongylid *lev-1* orthologs, suggesting that these subunits cannot be properly inserted in the membrane (Neveu *et al.*, 2010). Hco-LEV-1 was therefore omitted from subsequent expression experiments.

To determine which receptor genes can be combined to produce functional receptors, we removed receptor subunits either individually or in combination. Removal of the *Hco-acr-8* gene reduced expression by 93 ± 1.6 % (Figure 2). Despite this strong reduction,

expression was reliable and allowed the characterization of a second *H. contortus* receptor (Figure 3B). The combination of *Hco-unc-29.1*, *-38*, *-63a* and *Hco-acr-8* resulting in the expression of the first potential *H. contortus* L-AChR will be henceforth referred to as Hco-L-AChR1 whereas the combination of *Hco-unc-29.1*, *-38* and *-63a* will be referred to as Hco-L-AChR2. Hco-ACR-8 is an alpha-type AChR subunit and could theoretically assemble as a homopentamer, possibly explaining the observed difference between Hco-L-AChR1 and Hco-L-AChR2 injections. To test this hypothesis we injected Hco-ACR-8 with the three ancillary factors. While parallel expression of Hco-L-AChR1 was robust, we observed no currents for Hco-ACR-8 alone (n=11) demonstrating that Hco-ACR-8 does not assemble into homopentamers in our experimental conditions. Therefore, Hco-L-AChR1 and Hco-L-AChR2 differ most likely by the inclusion of Hco-ACR-8 in Hco-L-AChR1. Next, we removed *Hco-unc-29.1*, *Hco-unc-38* or *Hco-unc-63a* from the Hco-L-AChR1 injection mix. In the case of *Hco-unc-29.1* or *Hco-unc-63a*, no current was observed indicating that these two subunits are essential elements of the Hco-L-AChR1 (Figure 2 and 4B). In the case of *Hco-unc-38*, we could find very rare instances where a few oocytes showed very small currents (250 times smaller than control currents on average). Since in *Ascaris suum* AChRs were obtained by the co-expression of the two AChR subunits Asu-UNC-29 and Asu-UNC-38 alone (Williamson *et al.*, 2009), we coinjected *Hco-unc-29.1* in combination with *Hco-unc-38* or *Hco-unc-63a* (in addition to the three ancillary factors). These combinations never yielded any detectable current (Figure 2), indicating that results obtained in *Ascaris* are not transposable to *H. contortus*.

Finally, we investigated the requirement for *Hco-ric-3.1*, *Hco-unc-50* and *Hco-unc-74*. Injection of the Hco-L-AChR1 or Hco-L-AChR2 receptor subunits without the three ancillary factors never yielded any detectable currents (Figure 2). This clearly demonstrates the strict

requirement of these factors for expression of *H. contortus* L-AChR in *Xenopus* oocytes, as it was previously reported for *C. elegans* L-AChRs (Boulin *et al.*, 2008).

Pharmacology of *H. contortus* levamisole-sensitive AChRs

Pharmacological profiles of Hco-L-AChR1 and Hco-L-AChR2 were established using cholinergic agonists (ACh, Nic, DMPP) and anthelmintic agents (Lev, Pyr). Both receptors have strikingly different pharmacological profiles. While Hco-L-AChR1 strongly responds to levamisole ($148.8 \pm 7.6\%$ of ACh response), Hco-L-AChR2 response was much weaker ($32.7 \pm 4.2\%$ of ACh response) (Figure 3). In contrast, pyrantel responses were larger in Hco-L-AChR2 ($152.1 \pm 13.3\%$) than Hco-L-AChR1 ($8.1 \pm 1.4\%$). DMPP activated both receptors (Hco-L-AChR1: $48.5 \pm 1.7\%$; Hco-L-AChR2: $134.6 \pm 13.4\%$). But similarly to pyrantel, response to DMPP differed qualitatively in Hco-L-AChR2. While continuous application of pyrantel and DMPP on Hco-L-AChR1 yielded a rapidly activating response that quickly reached a plateau value (Figure 3A), continuous application of pyrantel and DMPP on Hco-L-AChR2 resulted in a rapidly decaying response (Figure 3B). In addition, a post-wash rebound could be seen in Hco-L-AChR2 but not in Hco-L-AChR1. These differences could be due to reversible channel block by pyrantel and DMPP. Alternatively, pyrantel and DMPP could promote the desensitized state of Hco-L-AChR2. Finally, while Hco-L-AChR1 failed to respond significantly to nicotine ($2.0 \pm 0.3\%$), Hco-L-AChR2 responded robustly to nicotine application ($62.2 \pm 2.5\%$), suggesting that at least one nicotine binding site is created when only the three receptor subunits *Hco-unc-29.1*, *Hco-unc-38* and *Hco-unc-63a* are co-expressed.

Next, we compared the relative sensitivities of Hco-L-AChR1 and Hco-L-AChR2 to acetylcholine and levamisole by establishing full dose-response curves (Figure 3C, 3D). We find that Hco-L-AChR1 has a significantly higher affinity for acetylcholine and levamisole

than Hco-L-AChR2. EC_{50} for ACh was $5.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ($n=5$) for Hco-L-AChR1 compared to $19.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ($n=7$) for Hco-L-AChR2. EC_{50} for Lev was $6.08 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ($n=5$) for Hco-L-AChR1 compared to $48.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ($n=4$) for Hco-L-AChR2. In contrast, cooperativity was more pronounced in the case of Hco-L-AChR2 as measured by the increase in Hill coefficient values (Hco-L-AChR1: ACh $nH = 1.16 \pm 0.08$ and Lev $nH = 1.15 \pm 0.04$; Hco-L-AChR2: ACh $nH = 1.42 \pm 0.06$ and Lev $nH: 1.52 \pm 0.03$).

These results demonstrate that two *H. contortus* levamisole-sensitive AChRs with very different pharmacology can be assembled in *Xenopus* oocytes depending on the set of receptors subunits that are provided. Given that no *in vivo* data is available in *H. contortus* regarding the spatial and temporal expression patterns of these receptor subunits, it is not possible at this stage to state whether both of these receptors are expressed *in vivo* and whether they could correspond to the multiple types of levamisole-sensitive acetylcholine receptors that have been described in the muscles of other parasitic nematodes (Robertson *et al.*, 1999).

The competitive antagonist DH E blocks nicotine-sensitive Hco-L-AChR2 but not nicotine-insensitive Hco-L-AChR1

In the presence of $100 \mu\text{M}$ acetylcholine, both Hco-L-AChR1 and Hco-L-AChR2 are efficiently blocked by the application of $100 \mu\text{M}$ of the canonical cholinergic antagonist d-Tubocurarine (dTC) ($97.0 \pm 1.9\%$ and $96.6 \pm 1.7\%$, respectively) (Figure 3E, 3F, 3H). However, the two receptors respond very differently to the competitive nicotinic antagonist dihydro- β -erythroidine (DH E). Consistent with their differential response to nicotine, DH E blocked ACh-activated currents in the nicotine-sensitive Hco-L-AChR2 very efficiently, but did not antagonise ACh-evoked currents in the nicotine-insensitive Hco-L-AChR1 ($64.7 \pm 7.6\%$ and $2.9 \pm 1.7\%$ respectively). This further suggests that a typical nicotine

binding site must be formed in *H. contortus* L-AChR when *Hco-acr-8* is absent. This pharmacology is also reminiscent of what was observed in *C. elegans* where L-AChRs are not activated by nicotine and insensitive to DH E while N-AChRs are activated by nicotine and blocked by DH E, both *in vivo* (Richmond *et al.*, 1999) and *in vitro* (Boulin *et al.*, 2008).

A truncated form of Hco-UNC-63 antagonises *H. contortus* L-AChR expression in *Xenopus* oocytes

The molecular mechanisms and the genes involved in levamisole resistance are still largely unknown in parasitic nematodes. The *unc-63* locus has emerged as a possible candidate since transcripts corresponding to truncated forms of *unc-63* mRNAs (*unc-63b*) were specifically identified in levamisole-resistant isolates of three trichostrongylid species (*H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*) (Neveu *et al.*, 2010). Intriguingly, these isolates also expressed full-length *unc-63* transcripts (*unc-63a*) in addition to the truncated mRNAs. The truncated *Hco-unc-63b* transcript identified in the *H. contortus* RHS6 isolate encodes a predicted protein of 343 amino acids including a signal peptide, the entire N-terminal extracellular domain, two transmembrane domains (TM1 and TM2) and 26 residues resulting from translation of the 3' UTR (Neveu *et al.*, 2010) (Figure 4A). Since co-expression of mammalian AChR subunits truncated after the M2 domain with wild-type subunits resulted in a decrease of surface receptors and associated receptor currents (Sumikawa *et al.*, 1994; Verrall *et al.*, 1992), the truncated Hco-UNC-63b forms might act as a dominant-negative on L-AChR expression.

To test this hypothesis, we injected increasing amounts of *Hco-unc-63b* cRNA with a fixed amount of wild-type L-AChR subunit cRNAs (Figure 4B). In agreement with the dominant-negative hypothesis, we observed a dose-dependent effect of Hco-UNC-63b on L-AChR currents. Injection of *Hco-unc-63b* RNA and Hco-L-AChR1 RNAs at a 2:1 ratio led to

a reduction in average current down to 36.5 ± 4.1 % of control (average of three independent experiments). When *Hco-unc-63b* RNA was injected at a 10:1 ratio, average current further decreased to 19.5 ± 2.2 % of control (Figure 4B). This significant reduction in expression was likely not due to the saturation of the expression machinery since the total amount of injected RNA in the 10:1 ratio experiment was equivalent to the amount of cRNA injected to express Hco-L-AChR1 in other experiments. We also verified that Hco-UNC-63b does not allow the formation of a functional receptor when *Hco-unc-63a* is omitted.

Taken together, these results suggest that co-expression of the truncated *Hco-unc-63b* form with wild-type *Hco-unc-63* subunits could inhibit the expression levels of the *H. contortus* levamisole-sensitive AChR and therefore could induce a levamisole-resistance phenotype in parasites expressing this mutant form.

Discussion and conclusion

We demonstrate here that two distinct *H. contortus* levamisole-sensitive acetylcholine receptors can be functionally reconstituted in *Xenopus* oocytes by providing different sets of receptor subunits. In addition, robust expression requires the presence of three conserved ancillary factors, similarly to what has been reported in the non-parasitic nematode *C. elegans* (Boulin *et al.*, 2008). This experimental system provides a unique means to describe the pharmacological and biophysical properties of *H. contortus* L-AChRs and to analyse the functional impact of sequence polymorphisms detected in levamisole-resistant nematodes.

Functional conservation of L-AChRs between *C. elegans* and *H. contortus*

One of the striking features of *C. elegans* is the number of AChR subunits encoded in the genome, at least 29 (Jones *et al.*, 2007), as compared to 17 in vertebrates. Despite its small number of neurons *C. elegans* is the species potentially expressing the most diverse repertoire of AChRs. Genomic studies suggest that many of these subunits are absent in parasitic nematodes including *B. malayi* and *A. suum* (Williamson *et al.*, 2007). Specifically, the *lev-1* and *lev-8* subunits, which are essential for L-AChR expression in *C. elegans*, were not found in these parasites, and L- and N-AChRs of these parasites can be reconstituted by expressing only different ratios of *unc-29* and *unc-38* without the need of accessory proteins (Williamson *et al.*, 2009). Such discrepancies might have reflected divergence caused by different life styles between parasitic and free living nematodes. Our current results rather suggest that it reflects the phylogenetic distance between *C. elegans* (clade V) and *B. malayi* and *A. suum* (clade III), since robust expression of L-AChR from *H. contortus* (clade V) requires 4 different AChR subunits and 3 ancillary proteins, similar to what we observed previously in *C. elegans*.

Interestingly, trichostrongylid orthologs of *lev-1* were readily identified but a sequence coding for a signal peptide could never be identified by inspection of genomic sequences or in cloned mRNAs. Consistently, injection of the *Hco-lev-1* cRNA did not change Hco-L-AChR1 expression and levamisole sensitivity, suggesting that it was indeed not incorporated into the receptor. The absence of deleterious variation in the coding sequence suggests, however, that *lev-1* remained under positive selection pressure. Whether complex genetic processing of the mRNA, such as *trans*-splicing between two mRNAs (Fischer *et al.*, 2008), occurs at specific developmental stages or in some specific cells to introduce a signal peptide into Hco-LEV-1 cannot be ruled out.

lev-8 could not be found in *H. contortus*, but functional L-AChR reconstitution indicates that ACR-8, the closest homolog of LEV-8 in *C. elegans*, is assembled in the receptor and plays a pivotal role in drug sensitivity. Two points might be meaningful. First, biochemical data in *C. elegans* suggest that ACR-8 might associate with other subunits found in muscle L-AChR (Gottschalk *et al.*, 2005). Second, the similarity between Hco- and Cel-ACR-8 is widely spread over the length of the primary amino-acid sequence, except for some motifs which are LEV-8 signatures in *C. elegans* (Figure 1B). Most notably, the principal ligand site defined by a YxxCC motif is identical for trichostrongylid ACR-8 and *C. elegans* LEV-8 (YPGCC vs. YAGCC for Cel-ACR-8). It is tempting to hypothesize that the conservation of these particular residues could be associated with their specific agonist-binding properties. It raises the possibility that *lev-8* and *acr-8* arose from a duplication that occurred after the divergence between strongyloidea and rhabditoidea.

Ancillary factors encoded by *ric-3*, *unc-50* and *unc-74* homologs are required for the expression of *H. contortus* L-AChRs in *Xenopus* oocytes, similarly to what was previously reported for *C. elegans* L-AChRs (Boulin *et al.*, 2008). Although orthologs of these three genes are present in the *Xenopus* genome, they cannot functionally replace their *C. elegans* or

H. contortus counterparts. They could be expressed at insufficient levels in unfertilized oocytes or their sequence might have diverged enough that they can not functionally replace their nematode counterparts. Recent work suggests that it is not the case for all parasitic levamisole receptors. *Ascaris suum* UNC-29 and UNC-38 can assemble into functional levamisole- and pyrantel-sensitive receptors in *Xenopus* oocytes in the absence of additional *A. suum* factors (Williamson *et al.*, 2009). However, this required the use of significantly greater amounts of receptor subunit RNA (25 ng of each subunit instead of 1.8 ng in this study) suggesting less efficient assembly or trafficking of the receptor, even though we can not exclude that observed differences could reflect L-AChR specific properties. A bioinformatic analysis of available genome and EST data from *A. suum* clearly identified partial sequences homologous to the three ancillary factors (Supplementary Figure S1). Whether these factors could be used to enhance the efficiency of *A. suum* L-AChR expression remains to be investigated.

Diversity of levamisole-sensitive receptors in nematodes

L-AChRs have been studied at the single channel level in *C. elegans*, *A. suum* and *O. dentatum*. These studies have highlighted some major differences between *C. elegans* and parasitic nematode L-AChR. For instance, three and four conductances ranging from 18 to 53 pS have been described for levamisole-activated channels in *A. suum* and *O. dentatum* respectively (Qian *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 1999) while only one conductance level (around 30 pS) was found in the *C. elegans* muscle (Qian *et al.*, 2008; Rayes *et al.*, 2007). Consistently, genetic evidence suggests that only a single L-AChR is expressed in *C. elegans* muscle (Richmond *et al.*, 1999). In addition, *C. elegans* muscle cells express a second class of AChRs, the N-AChR, with strikingly different biophysical and pharmacological properties. N-AChRs desensitize extremely rapidly upon prolonged exposure to agonists. They are

activated by nicotine, blocked by DH E and insensitive to levamisole. These differences are explained by the molecular composition of N-AChRs, which are homomers of the ACR-16 subunit, a subunit closely related to the γ subunit in mammals. By contrast, the origin of the diversity of parasitic AChRs is not understood at the genetic level.

Different levamisole-sensitive receptors could either contain different receptor subunits or the same subunits could be combined with different stoichiometries. *In vitro* experiment with *A. suum* levamisole receptors have suggested that different subunit stoichiometries could explain differences in pharmacology (Williamson *et al.*, 2009). We show here for *H. contortus* that two L-AChRs with very different pharmacological properties can be formed when the Hco-ACR-8 receptor subunit is present or absent. Strikingly, Hco-L-AChR1, which contain Hco-ACR-8, are very sensitive to levamisole, weakly responsive to pyrantel and insensitive to nicotine and DH E. Hco-L-AChR2, in which ACR-8 was removed, are less responsive to levamisole, more sensitive to pyrantel and respond to nicotine and DH E. Injecting Hco-ACR-8 with only two other receptor subunits never yielded any currents. We could therefore conclude that Hco-ACR-8 does not entirely replace another receptor subunit but rather that it must be included in the receptor in exchange for one or two other subunits. Indeed, the Hco-L-AChR2 receptor is formed when only Hco-UNC-29, Hco-UNC-38 and Hco-UNC-63a are co-injected. This allows for only two stoichiometries since each subunit is essential: either 3:1:1 or 2:2:1. When Hco-ACR-8 is added to form Hco-L-AChR1, the new subunit composition must be either (Hco-ACR-8)₁: 2:1:1 or (Hco-ACR-8)₂:1:1:1. Therefore, inclusion of Hco-ACR-8 will modify both the receptor's subunit composition and stoichiometry.

Our oocyte expression system allows for the first time to explore the possible subunit compositions of *H. contortus* acetylcholine receptors. Ideally, single channel experiments would be required to determine which receptor subtypes correspond to conductances *in vivo*,

potentially mirroring the three and four subtypes identified in *A. suum* and *O. dentatum* respectively. In addition, multiple paralogs exist for some of the subunits and it remains possible that specific combinations account for the diversity of conductances observed in parasitic nematode. However definitive assignment of specific subunit combinations to an *in vivo* conductance would require genetic experiments which are not yet feasible in these parasitic nematodes.

Mechanisms of levamisole resistance in trichostrongylid nematodes

In addition to the pharmacological characterization of *H. contortus* L-AChRs, we propose here the first mechanistic model explaining levamisole-resistance in certain isolates of trichostrongylid parasites. We had recently reported that truncated forms of the L-AChR subunit UNC-63 are co-expressed with their full-length counterparts in levamisole-resistant isolates of three trichostrongylid nematodes (*H. contortus* RHS6, *T. circumcincta* TciNZ and *T. colubriformis* TcoGA) (Neveu *et al.*, 2010). We hypothesized that truncated receptor subunits could have a dominant-negative effect on L-AChR function by competing with wild-type subunits during receptor assembly. This hypothesis was consistent with previous data obtained in mammalian muscle AChR where co-expression of truncated and full-length receptor subunits resulted in the alteration of receptor function or expression (Sumikawa *et al.*, 1994; Verrall *et al.*, 1992). We demonstrate that when co-expressed with Hco-L-AChR1 receptors in *Xenopus* oocytes, the truncated Hco-UNC-63b subunit has a strong dose-dependent dominant-negative effect on receptor expression.

Such a resistance mechanism, involving the down-regulation rather than complete loss of L-AChR expression might be more compatible with the parasitic lifestyle of *H. contortus*. Indeed, complete loss of L-AChRs in *C. elegans* null mutants of the *unc-63* receptor subunit

is accompanied by a strong uncoordinated movement phenotype. Since parasites are required to move efficiently to remain infective, the complete loss of L-AChRs might represent a strong selective disadvantage. Accordingly, levamisole binding experiments performed on wild-type and levamisole-resistant isolates identified changes in binding characteristics or in the expression level of levamisole-sensitive AChR rather than the absence of L-AChRs (Moreno-Guzman *et al.*, 1998; Sangster *et al.*, 1988; Sangster *et al.*, 1998). More generally, levamisole resistant parasites may be less well coordinated than wild-type nematodes and this loss of general fitness may make selection for levamisole resistance slower to develop and less stable than other types of anthelmintic resistance, in the absence of continuing anthelmintic selection pressure. In the future, our oocyte expression system will provide a means to test the functional relevance of polymorphisms linked to levamisole resistance and to characterize the sensitivity of wild-type and mutated receptors to known and forthcoming anthelmintic compounds.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Laetitia Mony, Shixin Ye, Shujia Zhu and David Stroebel for reagents, and Pierre Paoletti for feedback and helpful comments. We also thank Alexandra Blanchard-Letort for help with phylogenetic analyses. The *H. contortus* ISE and RHS6 isolates were kindly provided by Franck Jackson and Fred Boorgsteed respectively. Aymeric Fauvin is a grateful recipient of a PhD grant from “Région Centre” and Animal Health Division of INRA. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale "Equipe FRM".

Statement of conflicts of interest

The authors state no conflict of interest.

REFERENCES

- Aceves, J, Erlij, D, Martinez-Maranon, R (1970) The mechanism of the paralysing action of tetramisole on *Ascaris* somatic muscle. *Br J Pharmacol* **38**(3): 602-607.
- Almedom, RB, Liewald, JF, Hernando, G, Schultheis, C, Rayes, D, Pan, J, Schedletzky, T, Hutter, H, Bouzat, C, Gottschalk, A (2009) An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse. *EMBO J* **28**(17): 2636-2649.
- Altschul, SF, Madden, TL, Schaffer, AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller, W, Lipman, DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-3402.
- Amici, M, Eusebi, F, Miledi, R (2005) Effects of the antibiotic gentamicin on nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **49**(5): 627-637.
- Aubry, ML, Cowell, P, Davey, MJ, Shevde, S (1970) Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic: pyrantel. *Br J Pharmacol* **38**(2): 332-344.
- Beech, RN, Wolstenholme, AJ, Neveu, C, Dent, JA (2010) Nematode parasite genes: what's in a name? *Trends Parasitol* **26**(7): 334-340.
- Bendtsen, JD, Nielsen, H, von Heijne, G, Brunak, S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**(4): 783-795.
- Boulin, T, Gielen, M, Richmond, JE, Williams, DC, Paoletti, P, Bessereau, JL (2008) Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18590-18595.
- Castresana, J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**(4): 540-552.

Colquhoun L, Holden-Dye L, Walker RJ (1991). The pharmacology of cholinceptors on the somatic muscle cells of the parasitic nematode *Ascaris suum*. *J Exp Biol* **158**: 509-530.

Culetto, E, Baylis, HA, Richmond, JE, Jones, AK, Fleming, JT, Squire, MD, Lewis, JA, Sattelle, DB (2004) The *Caenorhabditis elegans* unc-63 gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *J Biol Chem* **279**(41): 42476-42483.

Edgar, RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**(5): 1792-1797.

Eimer, S, Gottschalk, A, Hengartner, M, Horvitz, HR, Richmond, J, Schafer, WR, Bessereau, JL (2007) Regulation of nicotinic receptor trafficking by the transmembrane Golgi protein UNC-50. *EMBO J* **26**(20): 4313-4323.

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. *Mol Biochem Parasitol* **170**(2): 105-107.

Fischer, SE, Butler, MD, Pan, Q, Ruvkun, G (2008) Trans-splicing in *C. elegans* generates the negative RNAi regulator ERI-6/7. *Nature* **455**(7212): 491-496.

Fleming, JT, Squire, MD, Barnes, TM, Tornoe, C, Matsuda, K, Ahnn, J, Fire, A, Sulston, JE, Barnard, EA, Sattelle, DB, Lewis, JA (1997) *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes lev-1, unc-29, and unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J Neurosci* **17**(15): 5843-5857.

Gottschalk, A, Almedom, RB, Schedletzky, T, Anderson, SD, Yates, JR, 3rd, Schafer, WR (2005) Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* **24**(14): 2566-2578.

Halevi, S, McKay, J, Palfreyman, M, Yassin, L, Eshel, M, Jorgensen, E, Treinin, M (2002) The *C. elegans* ric-3 gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *Embo J* **21**(5): 1012-1020.

Halevi, S, Yassin, L, Eshel, M, Sala, F, Sala, S, Criado, M, Treinin, M (2003) Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression. *J Biol Chem* **278**(36): 34411-34417.

Harrow ID, Gration AF (1985). Mode of action of the anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole on muscle cell membrane of the nematode *Ascaris suum*. *Pestic Sci* **16**: 662-672.

Haugstetter, J, Blicher, T, Ellgaard, L (2005) Identification and characterization of a novel thioredoxin-related transmembrane protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **280**(9): 8371-8380.

Hoekstra, R, Visser, A, Wiley, LJ, Weiss, AS, Sangster, NC, Roos, MH (1997) Characterization of an acetylcholine receptor gene of *Haemonchus contortus* in relation to levamisole resistance. *Mol Biochem Parasitol* **84**(2): 179-187.

Jones, AK, Davis, P, Hodgkin, J, Sattelle, DB (2007) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode *Caenorhabditis elegans*: an update on nomenclature. *Invert Neurosci* **7**(2): 129-131.

Jospin, M, Qi, YB, Stawicki, TM, Boulin, T, Schuske, KR, Horvitz, HR, Bessereau, JL, Jorgensen, EM, Jin, Y (2009) A neuronal acetylcholine receptor regulates the balance of muscle excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol* **7**(12): e1000265.

Kaplan, RM (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* **20**(10): 477-481.

Lewis, JA, Elmer, JS, Skimming, J, McLafferty, S, Fleming, J, McGee, T (1987) Cholinergic receptor mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **7**(10): 3059-3071.

Lewis, JA, Wu, CH, Berg, H, Levine, JH (1980) The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **95**(4): 905-928.

Martin RJ, Clark CL, Trailovic SM, Robertson AP (2004). Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in *Ascaris*. *Int J Parasitol* **34**(9): 1083-1090.

Millar, NS (2008) RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**: S177-183.

Mitreva, M, McCarter, JP, Martin, J, Dante, M, Wylie, T, Chiapelli, B, Pape, D, Clifton, SW, Nutman, TB, Waterston, RH (2004) Comparative genomics of gene expression in the parasitic and free-living nematodes *Strongyloides stercoralis* and *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* **14**(2): 209-220.

Moreno-Guzman, MJ, Coles, GC, Jimenez-Gonzalez, A, Criado-Fornelio, A, Ros-Moreno, RM, Rodriguez-Caabeiro, F (1998) Levamisole binding sites in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* **28**(3): 413-418.

Neveu, C, Charvet, CL, Fauvin, A, Cortet, J, Beech, RN, Cabaret, J (2010) Genetic diversity of levamisole receptor subunits in parasitic nematode species and abbreviated transcripts associated with resistance. *Pharmacogenet Genomics* **20**(7): 414-425.

Paoletti, P, Neyton, J, Ascher, P (1995) Glycine-independent and subunit-specific potentiation of NMDA responses by extracellular Mg²⁺. *Neuron* **15**(5): 1109-1120.

Qian, H, Martin, RJ, Robertson, AP (2006) Pharmacology of N-, L-, and B-subtypes of nematode nAChR resolved at the single-channel level in *Ascaris suum*. *FASEB J* **20**(14): 2606-2608.

Qian, H, Robertson, AP, Powell-Coffman, JA, Martin, RJ (2008) Levamisole resistance resolved at the single-channel level in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J*.

Rayes, D, Flamini, M, Hernando, G, Bouzat, C (2007) Activation of single nicotinic receptor channels from *Caenorhabditis elegans* muscle. *Mol Pharmacol* **71**(5): 1407-1415.

Richmond, JE, Jorgensen, EM (1999) One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nat Neurosci* **2**(9): 791-797.

Robertson, AP, Bjorn, HE, Martin, RJ (1999) Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. *FASEB J* **13**(6): 749-760.

Roos, MH, Otsen, M, Hoekstra, R, Veenstra, JG, Lenstra, JA (2004) Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* **34**(1): 109-115.

Sangster, NC, Riley, FL, Collins, GH (1988) Investigation of the mechanism of levamisole resistance trichostrongylid nematodes of sheep. *Int J Parasitol* **18**(6): 813-818.

Sangster, NC, Riley, FL, Wiley, LJ (1998) Binding of [³H]m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* **28**(5): 707-717.

Schultz, J, Milpetz, F, Bork, P, Ponting, CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 5857-5864.

Sumikawa, K, Nishizaki, T (1994) The amino acid residues 1-128 in the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor contain assembly signals. *Brain Res Mol Brain Res* **25**(3-4): 257-264.

Towers, PR, Edwards, B, Richmond, JE, Sattelle, DB (2005) The *Caenorhabditis elegans* lev-8 gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurochem* **93**(1): 1-9.

Tyrrell, KL, LeJambre, LF (2010) Overcoming macrocyclic lactone resistance in *Haemonchus contortus* with pulse dosing of levamisole. *Vet Parasitol* **168**(3-4): 278-283.

Verrall, S, Hall, ZW (1992) The N-terminal domains of acetylcholine receptor subunits contain recognition signals for the initial steps of receptor assembly. *Cell* **68**(1): 23-31.

Walker, J, Hoekstra, R, Roos, MH, Wiley, LJ, Weiss, AS, Sangster, NC, Tait, A (2001) Cloning and structural analysis of partial acetylcholine receptor subunit genes from the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Parasitol* **97**(4): 329-335.

Waller, PJ, Chandrawathani, P (2005) *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop Biomed* **22**(2): 131-137.

Wiley, LJ, Weiss, AS, Sangster, NC, Li, Q (1996) Cloning and sequence analysis of the candidate nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit gene *tar-1* from *Trichostrongylus colubriformis*. *Gene* **182**(1-2): 97-100.

Williamson, SM, Robertson, AP, Brown, L, Williams, T, Woods, DJ, Martin, RJ, Sattelle, DB, Wolstenholme, AJ (2009) The nicotinic acetylcholine receptors of the parasitic nematode *Ascaris suum*: formation of two distinct drug targets by varying the relative expression levels of two subunits. *PLoS Pathog* **5**(7): e1000517.

Williamson, SM, Walsh, TK, Wolstenholme, AJ (2007) The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Brugia malayi* and *Trichinella spiralis*: a comparison with *Caenorhabditis elegans*. *Invert Neurosci* **7**(4): 219-226.

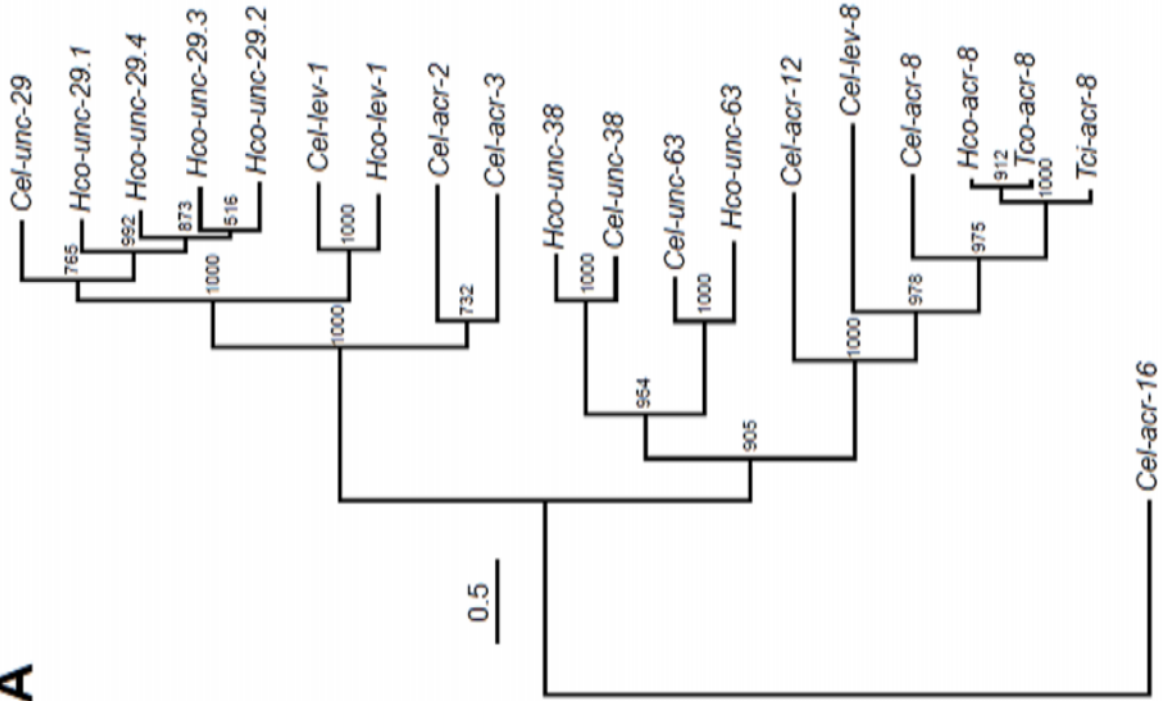
Table 1. Comparison of *H. contortus* ancillary factor with their *C. elegans* orthologs.

Gene name	Accession number	Full-length cDNA size (bp)	Protein sequence length (aa)	<i>C. elegans</i> ortholog (e value)	% amino acid identity / similarity
<i>Hco-ric-3.1</i>	HQ116823	1465	365	Cel-RIC-3 (3e-54)	56/70
<i>Hco-ric-3.2</i>	HQ116824	1468	365	Cel-RIC-3 (5e-54)	56/70
<i>Hco-unc-50</i>	HQ116822	1350	298	Cel-UNC-50 (5e-112)	73/84
<i>Hco-unc-74</i>	HQ116821	1574	445	Cel-UNC-74 (2e-123)	51/70

FIGURE LEGENDS**Figure 1. Phylogeny of L-AChR subunits in *C. elegans* and trichostrongylid nematodes.**

(A) Tree construction was performed on full-length cDNA sequences. Numbers at each node indicate bootstrap values corresponding to 1000 replicates. The scale bar represents nucleotide substitutions per site. The *C. elegans* *acr-16* N-AChR subunit gene was used as an outgroup. The three letter prefixes in AChR subunit gene names *Cel*, *Hco*, *Tci* and *Tco* refer to *C. elegans*, *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis* respectively. The five *C. elegans* AChR subunits required for the functional expression of the levamisole-sensitive AChR in *Xenopus* oocytes are labeled in red. (B) LEV-8 and ACR-8 sequences were aligned using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004) and further processed using GeneDoc. Predicted signal peptide sequences are shaded in grey. Amino acids conserved between *Cel*-LEV-8 and trichostrongylid ACR-8 sequences – but not *C. elegans* ACR-8 – are highlighted in red. The cys-loop, the four transmembrane regions (TM1–TM4) and the primary agonist binding site are noted above the sequence.

A



B

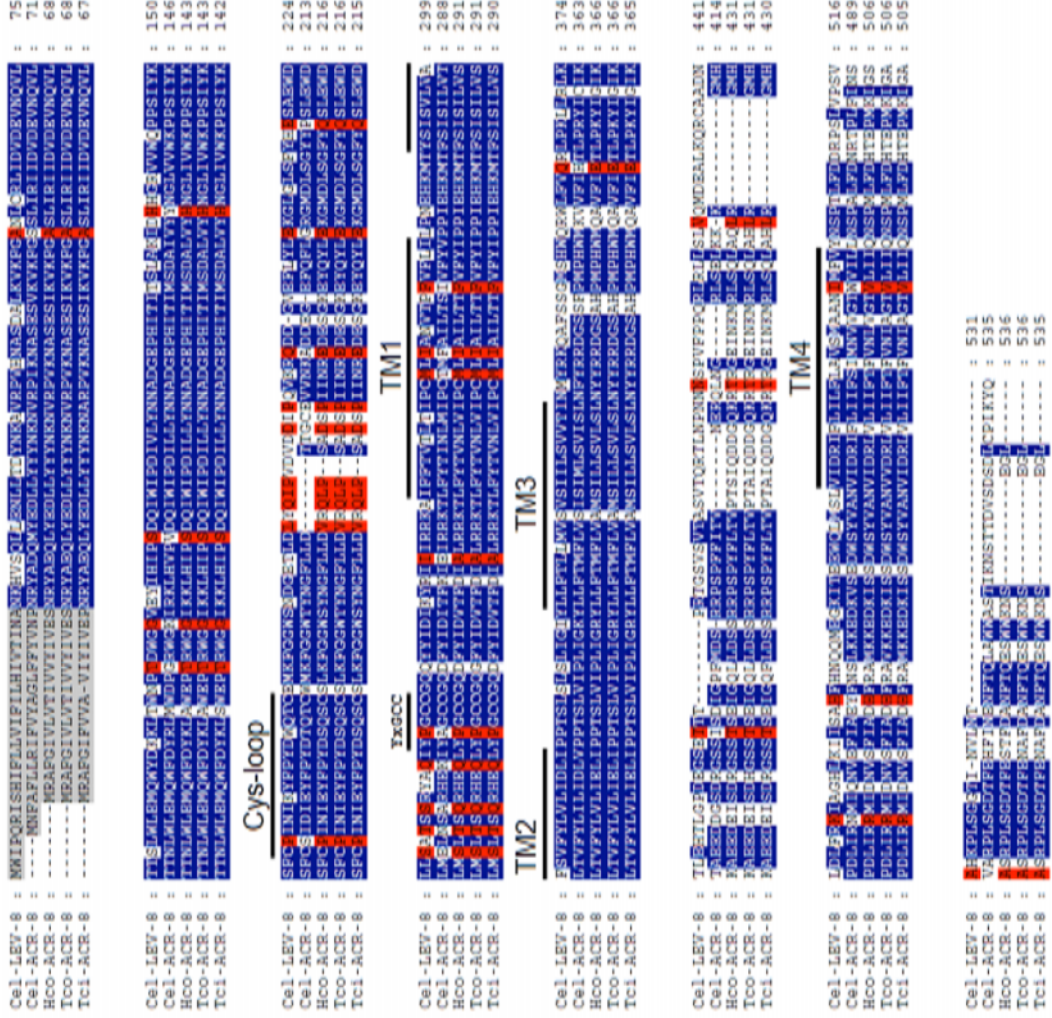


Figure 2. Four receptor subunits and three ancillary factors are required for efficient expression of Hco-L-AChR1.

Coinjection of four receptor subunits (black squares) and three ancillary factors (grey squares) yields the strongest currents (average 540 nA (n=24) with 500 μ M ACh). Removal of the *Hco-acr-8* subunit from the injection mix reduced average currents by 93 ± 1.6 % (n=28). No other combination yielded any measurable currents, except in very rare instances when *Hco-unc-38* was removed. In particular, coinjection of four Hco-L-AChR1 subunits alone is not sufficient for expression highlighting the crucial role of the three ancillary factors Hco-RIC-3.1, Hco-UNC-50, and Hco-UNC-74. Currents were measured once the steady state was reached. Numbers above bars indicate the number of oocytes recorded for each condition.

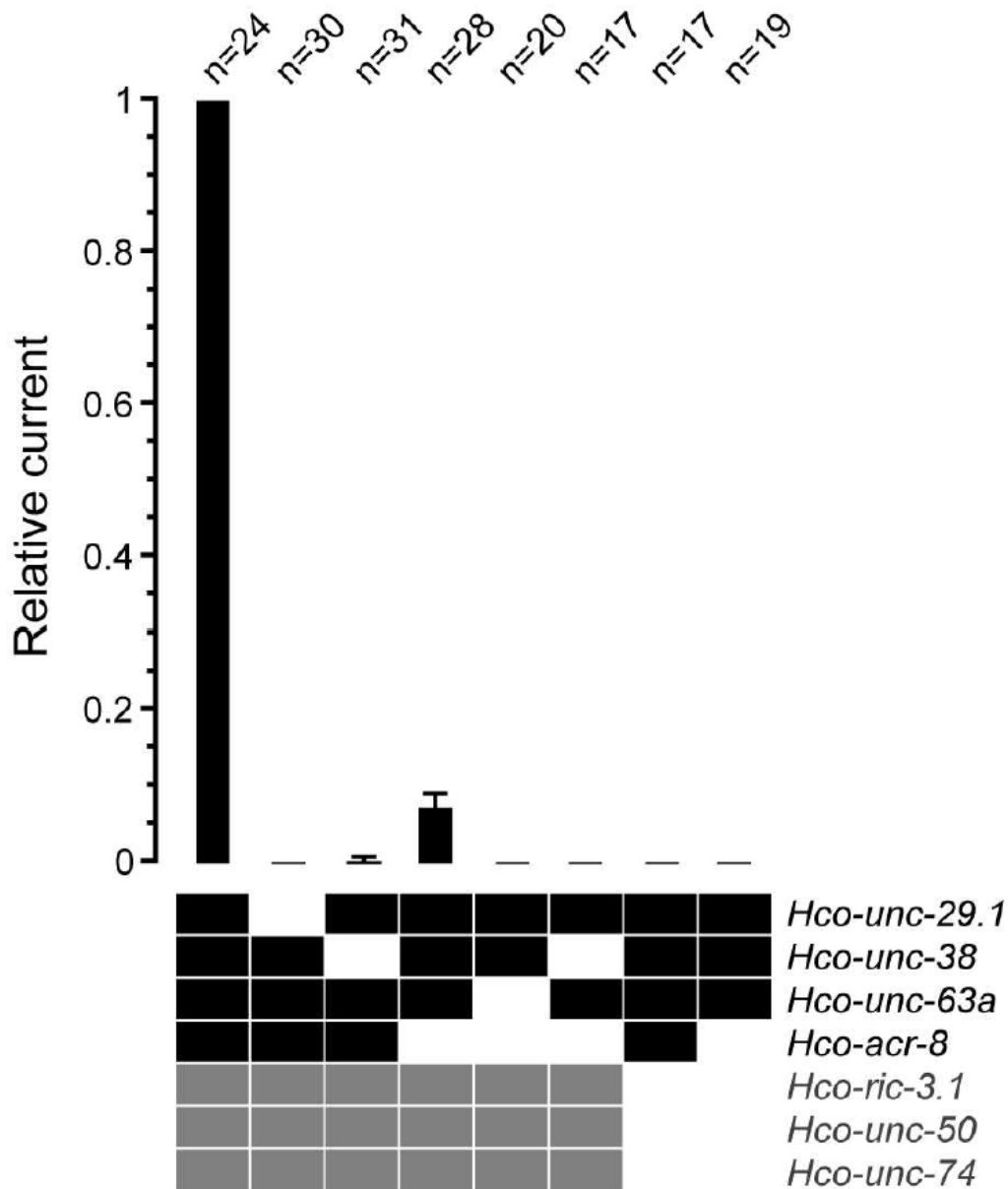


Figure 2. Four receptor subunits and three ancillary factors are required for efficient expression of Hco-L-AChR1.

Coinjection of four receptor subunits (black squares) and three ancillary factors (grey squares) yields the strongest currents (average 540 nA (n=24) with 500 μ M ACh). Removal of the Hco-*acr-8* subunit from the injection mix reduced average currents by $93 \pm 1.6\%$ (n=28). No other combination yielded any measurable currents, except in very rare instances when Hco-*unc-38* was removed. In particular, coinjection of four Hco-L-AChR1 subunits alone is not sufficient for expression highlighting the crucial role of the three ancillary factors Hco-RIC-3.1, Hco-UNC-50, and Hco-UNC-74. Currents were measured once the steady state was reached. Numbers above bars indicate the number of oocytes recorded for each condition.

76x91mm (300 x 300 DPI)

Figure 3. Pharmacology of *H. contortus* levamisole-sensitive AChR

(A) Hco-L-AChR1 and (B) Hco-L-AChR2 were challenged with a series of cholinergic agonists (ACh, DMPP, Nic) and anthelmintic agents (Lev, Pyr). (C) and (D) ACh (black circles) and Lev (black squares) dose-response curves for Hco-L-AChR1 and Hco-L-AChR2 respectively. The values indicated by open square and open circles were excluded from the fit. (E) and (F) Differential response of Hco-L-AChR to cholinergic antagonists. Currents elicited by 100 μ M ACh can be efficiently blocked by 100 μ M dTC in Hco-L-AChR1 ($97 \pm 1.9\%$) and Hco-L-AChR2 ($97 \pm 1.7\%$). In contrast, the competitive antagonist DH E only blocks ACh-induced currents in Hco-L-AChR2 ($65 \pm 7.6\%$) but not in Hco-L-AChR1 ($2.9 \pm 1.7\%$) consistently with the specific sensitivity of Hco-L-AChR2 to nicotine. (G) Relative efficacy of cholinergic agonists. Black bars correspond to Hco-L-AChR1, grey bars to Hco-L-AChR2. All values are normalized to the current elicited by application of 100 μ M ACh. Hco-L-AChR1: Lev $148.8 \pm 7.6\%$; Pyr $8.1 \pm 1.4\%$; Nic $2.0 \pm 0.3\%$; DMPP $48.5 \pm 1.7\%$. Hco-L-AChR2: Lev $32.7 \pm 4.2\%$; Pyr $152.1 \pm 13.3\%$; Nic $62.2 \pm 2.5\%$; DMPP $134.6 \pm 13.4\%$. Numbers above bars indicate the number of oocytes recorded for each condition. (H) Relative efficacies of cholinergic antagonists. Black bars correspond to Hco-L-AChR1, grey bars correspond to Hco-L-AChR2. In (A), (B), (E) and (F) black horizontal bars indicate when agonists and antagonists are applied. All concentrations are indicated in μ M. All oocytes were treated with 100 μ M BAPTA-AM for four hours prior to recording. All recordings were made with 1 mM external CaCl_2 .

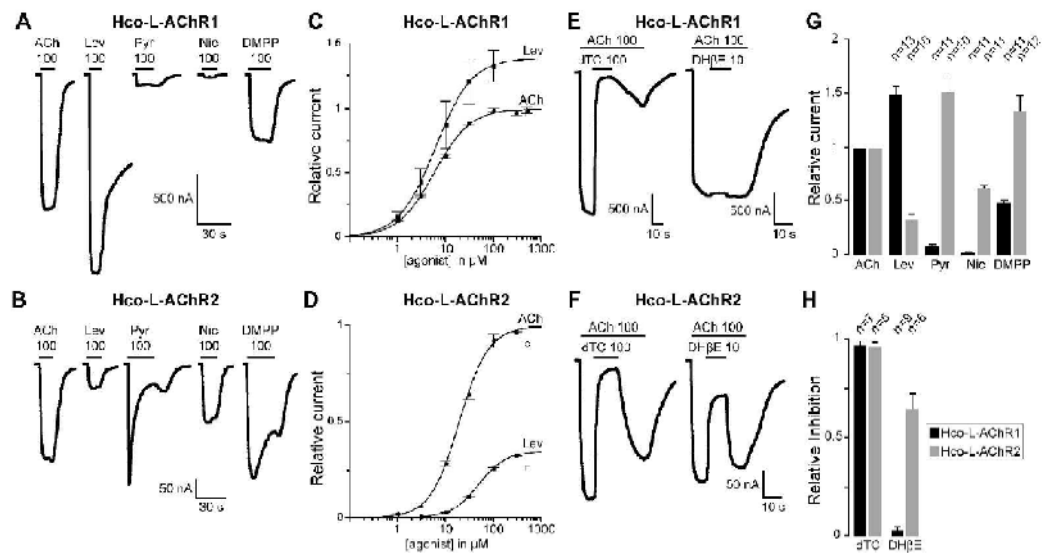


Figure 3. Pharmacology of *H. contortus* levamisole-sensitive AChR
 (A) Hco-L-AChR1 and (B) Hco-L-AChR2 were challenged with a series of cholinergic agonists (ACh, DMPP, Nic) and anthelmintic agents (Lev, Pyr). (C) and (D) ACh (black circles) and Lev (black squares) dose-response curves for Hco-L-AChR1 and Hco-L-AChR2 respectively. The values indicated by open square and open circles were excluded from the fit. (E) and (F) Differential response of Hco-L-AChR to cholinergic antagonists. Currents elicited by 100 μ M ACh can be efficiently blocked by 100 μ M dTC in Hco-L-AChR1 ($97 \pm 1.9\%$) and Hco-L-AChR2 ($97 \pm 1.7\%$). In contrast, the competitive antagonist DH β E only blocks ACh-induced currents in Hco-L-AChR2 ($65 \pm 7.6\%$) but not in Hco-L-AChR1 ($2.9 \pm 1.7\%$) consistently with the specific sensitivity of Hco-L-AChR2 to nicotine. (G) Relative efficacy of cholinergic agonists. Black bars correspond to Hco-L-AChR1, grey bars to Hco-L-AChR2. All values are normalized to the current elicited by application of 100 μ M ACh. Hco-L-AChR1: Lev $148.8 \pm 7.6\%$; Pyr $8.1 \pm 1.4\%$; Nic $2.0 \pm 0.3\%$; DMPP $48.5 \pm 1.7\%$. Hco-L-AChR2: Lev $32.7 \pm 4.2\%$; Pyr $152.1 \pm 13.3\%$; Nic $62.2 \pm 2.5\%$; DMPP $134.6 \pm 13.4\%$. Numbers above bars indicate the number of oocytes recorded for each condition. (H) Relative efficacies of cholinergic antagonists. Black bars correspond to Hco-L-AChR1, grey bars correspond to Hco-L-AChR2. In (A), (B), (E) and (F) black horizontal bars indicate when agonists and antagonists are applied. All concentrations are indicated in μ M. All oocytes were treated with 100 μ M BAPTA-AM for four hours prior to recording. All recordings were made with 1 mM external CaCl₂.

199x104mm (600 x 600 DPI)

Figure 4. Dominant-negative effect of a truncated form of Hco-UNC-63 on Hco-L-AChR1 currents.

(A) Schematic representation of Hco-UNC-63a and Hco-UNC-63b. The Hco-UNC-63b truncated protein retains a signal peptide, the entire N-terminal extracellular domain, two transmembrane domains (TM1 and TM2) and has an additional 26 C-terminal residues resulting from the translation of 3' UTR sequences. (B) Expression of Hco-UNC-63b in the context of Hco-L-AChR1 decreases receptor expression by 36.5 ± 4.1 % (2:1 ratio) and 19.5 ± 2.2 % (10:1 ratio). Hco-UNC-63a is an essential component of Hco-L-AChR1 and Hco-UNC-63b can not substitute for wild-type Hco-UNC-63a to form functional receptors. "+" and "-" indicate when a component has been added or not. In each case *Hco-acr-8*, *Hco-unc-29.1*, *Hco-unc-38*, *Hco-ric-3.1*, *Hco-unc-50* and *Hco-unc-74* were coinjected with either one or both *Hco-unc-63* cRNA variants. "2:1" and "10:1" indicate the relative ratio of truncated to wild-type *Hco-unc-63* used. Each wild-type cRNA was injected at 25 ng/ μ L (vs. 50 ng/ μ L in all other experiments). Average currents for Hco-L-AChR1 were 161 ± 144 nA. Currents were recorded two days after injection.

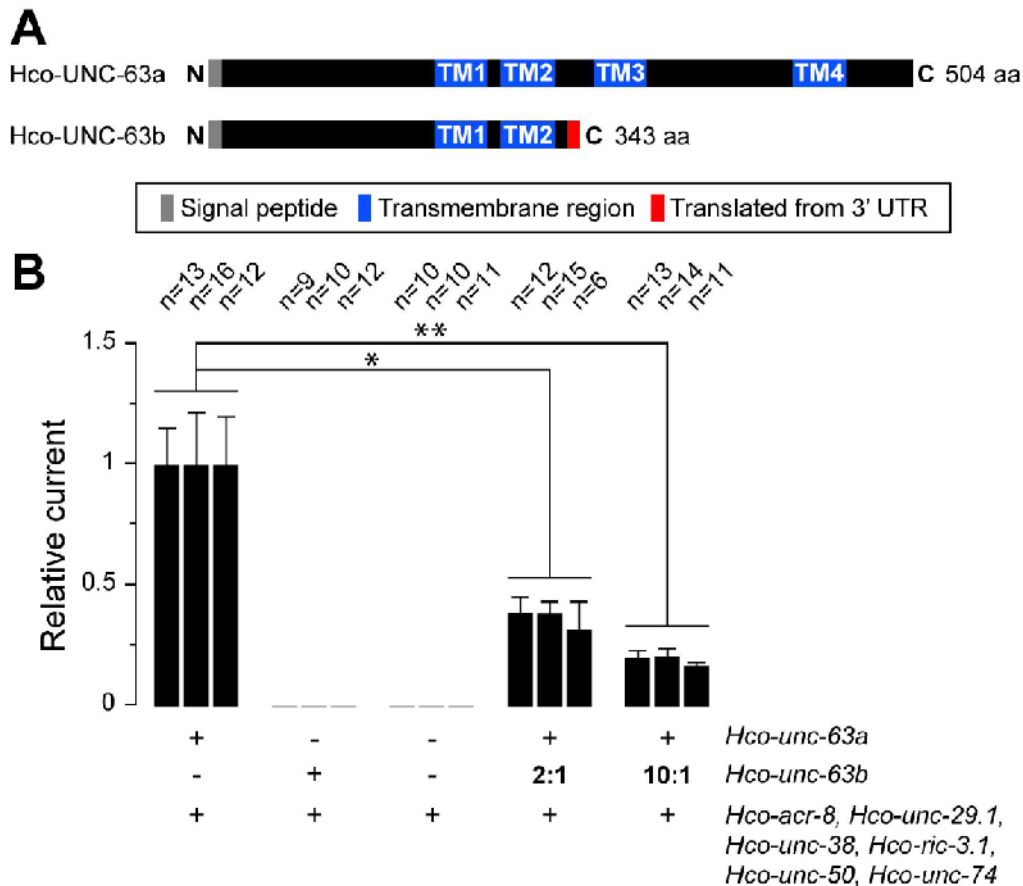


Figure 4. Dominant-negative effect of a truncated form of Hco-UNC-63 on Hco-L-AChR1 currents. (A) Schematic representation of Hco-UNC-63a and Hco-UNC-63b. The Hco-UNC-63b truncated protein retains a signal peptide, the entire N-terminal extracellular domain, two transmembrane domains (TM1 and TM2) and has an additional 26 C-terminal residues resulting from the translation of 3' UTR sequences. (B) Expression of Hco-UNC-63b in the context of Hco-L-AChR1 decreases receptor expression by 36.5 ± 4.1 % (2:1 ratio) and 19.5 ± 2.2 % (10:1 ratio). Hco-UNC-63a is an essential component of Hco-L-AChR1 and Hco-UNC-63b can not substitute for wild-type Hco-UNC-63a to form functional receptors. "+" and "-" indicate when a component has been added or not. In each case Hco-*acr-8*, Hco-*unc-29.1*, Hco-*unc-38*, Hco-*ric-3.1*, Hco-*unc-50* and Hco-*unc-74* were coinjected with either one or both Hco-unc-63 cRNA variants. "2:1" and "10:1" indicate the relative ratio of truncated to wild-type Hco-unc-63 used. Each wild-type cRNA was injected at $25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (vs. $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ in all other experiments). Average currents for Hco-L-AChR1 were $161 \pm 144 \text{ nA}$. Currents were recorded two days after injection.

86x75mm (600 x 600 DPI)

Table S1. Primer sequences used for 3' RACE and SL1-PCR experiments.

Gene name	Primer Name	Primer sequence
<i>Hco-acr-8</i>	HC8-F1	ATGAGCGATGCCCTCGTCTAT
	HC8-F2	ATGGAGCTACAATGGATTCCCT
	HC8-R1	CAGTTCTCTCCGATCGAGTAC
	HC8-R2	GCAACATAGGACCAGTCGGAA
<i>Tci-acr-8</i>	TCI8-F1	TGGTTAGARATGCAATGGTTY
	TCI8-F2	TTTGGWGGWTGGASYTAYAAY
	TCI8-R1	TGAAGTTCGCATCGAAGGCAT
	TCI8-R2	AGCAACGTAGGACCAGTCGGA
<i>Tco-acr-8</i>	TCO8-F1	= TCI8-F1
	TCO8-F2	= TCI8-F2
	TCO8-R1	ATCACTTGTTAGCGGCACAGAT
	TCO8-R2	GATAAGGACCGTACCAGCAA
<i>Hco-ric-3</i>	3-F1	ACAGGATGGAACTTGGTTTG
	3-F2	CATCCAATGCTGATGAGCCTA
	3-R1	ATCCATGTCGACGGAGGCTCT
	3-R2	TGCACCTTCCGCTTTCTGATC
<i>Hco-unc-50</i>	50-F1	CTTCGAAAAGTGCAGGACCAA
	50-F2	CTCAACGCCTTCTTCCCCATG
	50-R1	GAAGAAGGCGTTGAGATGCAC
	50-R2	TGGTCCTGCACTTTTCGAAGA
<i>Hco-unc-74</i>	74-F1	TCAGCAGACTTCAGTGTTGAC
	74-F2	ACTAGTCGACCAGAACCACGT
	74-R1	ACGTGGTTCTGGTCGACTAGT
	74-R2	GTCAACACTGAAGTCTGCTGA

Table S2. Primers used for cDNA amplification and cloning.

Gene name	Primer Name	Primer sequence
<i>Hco-acr-8</i>	pAF8-F	AAACTCGAGatgcgtgcgttcggaattggt
	pAF8-R	TTTGGGCCCCtataaaccttcagagttcttcc
<i>Hco-ric-3</i>	pAF10-F	AAACTCGAGatgcctgttcacggggegag
	pAF10-R	TTTGGGCCCTtagacttttttcggtcgctcgc
<i>Hco-unc-29.1</i>	pAF1-F	AAAAAGCTTatgcgtttcgaactcctgatt
	pAF1-R	TTTGGGCCCTtaatcacgatttccgccact
<i>Hco-unc-38</i>	pAF6-F	AAACTCGAGatgacgacatttactgagctttg
	pAF6-R	TTTGGGCCCTcaaacacagagcgctcaaattc
<i>Hco-unc-50</i>	pAF11-F	AAACTCGAGatgcataacagctccaggaac
	pAF11-R	TTTGGGCCCCtaatcgtctgttcgaactcgata
<i>Hco-unc-63a</i>	pAF5-F	AAACTCGAGatgctgacgcgacaagtgttt
	pAF5-R	TTTGGGCCCCctacgccagaggtaccgtagt
<i>Hco-unc-63b</i>	pAF15-F	= pAF5-F
	pAF15-R	TTTGGGCCCTtaaacaaagagtgccgacgg
<i>Hco-unc-74</i>	pAF12-F	AAACTCGAGatgcagttctatccgctaattct
	pAF12-R	TTTGGGCCCTtattcattctttacgtggttctgg

Supplementary Figure S1. Conservation of RIC-3, UNC-50 and UNC-74 ancillary factors in *A. suum*, *B. malayi*, *C. elegans* and *H. contortus*.

Protein alignments were constructed using the MUSCLE algorithm and were further processed using GeneDoc. Consensus regions are shaded in blue. A) RIC-3 homologs. The seven amino acids which differ between Hco-RIC-3.1 and Hco-RIC-3.2 are labeled in cyan. Domain annotations correspond to *C. elegans* RIC-3. The two transmembrane domains and the three coiled-coil domains are noted above the sequence. The *Brugia malayi* alignment is based on two partial sequences: kb29b08.y1 and XP_001898706.1. The names of the partial RIC-3 sequences from *A. suum* are indicated below the sequence. B) UNC-50 homologs. Domain annotations correspond to *C. elegans* UNC-50. The five transmembrane domains are noted above the sequence. The *Brugia malayi* alignment is based on XP_1895364.1. The names of the partial sequences from *A. suum* used for the alignment are indicated below the sequence. C) UNC-74 homologs. Domain annotations correspond to *C. elegans* UNC-74. The C-terminal transmembrane domain and the thioredoxin domain are noted above the sequence. The *Brugia malayi* alignment is based on XP_001901171.1. ED247067 was the only partial sequences from *A. suum* retrieved during our bioinformatic analysis.

A

		TM1			
Hco-RIC-3.1	---MPVHGREERKRKRRESDEDD	---SVFTGWKIGLVGVVITCFAMLYPTLIHPMLMSLGRSPPPPFAV	---PSRPPHFGMGGGGGRPGGSRHDVHP	: 96	
Hco-RIC-3.2	---MPVHGREERKRKRRESDEDD	---SVFTGWKIGLVGVVITCFAMLYPTLIHPMLMSLGRSPPPPFAV	---PSRPPHFGMGGGGGRPGGSRHDVHP	: 96	
Cel-RIC-3	MPKTERDRDRDRERKRKRRESDEDD	GGISGWKIGLVGVVITCFAMLYPTLIHPMLMSLGRSPPPPFAV	INQORPPHFGMGGGGGRPGGSRHDVHP	: 107	
B. malayi	---RRRQRTESEESP	---LSGWKIGLVGVVITCFAMLYPSMHPLISSFF	---WSPARKTV	---TNRPPHFPAMSSPR	: 76
A. suum	---REERKRKRKRRESDEDD	---ESGWKIGLVGVVITCFAMLYPSMHPMISSFF	---CGGPP	---PPFALP	: 63
	AS06487	ED311593	AS04797		
		TM2			
Hco-RIC-3.1	---AMRMAQQAAE	---TQSSGRGFTWMLPLYTVGVVIFLLYTLFKSKGKRK	---RRSRYGSSDESSDDDDVYNSRLKKIKRKLRSLOERLQOOTEAMSKILEQLEAVQAA	: 200	
Hco-RIC-3.2	---AMRMAQQAAE	---TQSSGRGFTWMLPLYTVGVVIFLLYTLFKSKGKRK	---RRSRYGSSDESSDDDDVYNSRLKKIKRKLRSLOERLQOOTEAMSKILEQLEAVQAA	: 200	
Cel-RIC-3	---AMRMAQQAAE	---QSGGSKGFTWMLPVYTIQVIVLFLYTLFKSKGKRKRKRNYFDE	---DDDESEETKYGKFKKKLEGLQRLRETEAMSKILEQLEAVQAA	: 212	
B. malayi	---GMRVATSPDITTPSSSKGMFAWMLPIYTIQVIVLFLYTLFKSKGKRKRKRNYFDE	---DDDESEETKYGKFKKKLEGLQRLRETEAMSKILEQLEAVQAA	---	: 184	
A. suum	---SPPFG	---GPPSSKGMFAWMLPLYTVGVVIFLLYTLFKSKGKRKRKRNYFDE	---DDDESEETKYGKFKKKLEGLQRLRETEAMSKILEQLEAVQAA	: 120	
	ED461065		ED156441		
Hco-RIC-3.1	---GALAEGLPKKD	---PGEKEDQKAEAGANEVNP	---KNEQYINDLEKALRDFKILSEAYEDEKSL	---RHGSHSQSEEDETSSEELNSGSDDEEENEQPVKDSGRK	: 303
Hco-RIC-3.2	---GALAEGLPKKD	---PGEKEDQKAEAGANEVNP	---KNEQYINDLEKALRDFKILSEAYEDEKSL	---RHGSHSQSEEDETSSEELNSGSDDEEENEQPVKDSGRK	: 303
Cel-RIC-3	---SAMPVDLDAADKRSEQLLEDPVKEAVGLTE	---NEQYINDLEKALRDFKILSEAYEDEKSL	---RHGSHSQSEEDETSSEELNSGSDDEEENEQPVKDSGRK	---	: 315
B. malayi	---VATKQNLAEET	---NKLSLNCSDQDQD	---KTEQYINDLEKALRDFKILSEAYEDEKSL	---RHGSHSQSEEDETSSEELNSGSDDEEENEQPVKDSGRK	: 279
A. suum	---P	---TQCAVPQNLQENTVDQKSKNGESKKADV	---DKEHYRDLKVI	---	: 162
	ED156441		ED156441		
			C. elegans coiled-coil domain		
Hco-RIC-3.1	---TKRSKDSBEDAEDASEBELLKETY	---KSAHNHVKENTPPAEST	---VTSKESTKSA	---KQVRRRPPKV	: 365
Hco-RIC-3.2	---TKRSKDSBEDAEDASEBELLKETY	---KSAHNHVKENTPPAEST	---VTSKESTKSA	---KQVRRRPPKV	: 365
Cel-RIC-3	---QSVGKRAKRPKSTSEEDGEGERKVAEDAEE	---GIDIDSEIREHAKEKEKDKNVRREPKKT	---	---	: 378
B. malayi	---IKRGS	---	---	---	: 285
A. suum	---	---	---	---	: 285

B

Hco-UNC-50 : MENSSENTPALVQPGTSGICSPITLDTCRFRGSSISDQ TATPGCFSTYSTS - DRVGCPTAVRMSAKAKLFRFRFRFHPKQMDPEFALWQMLYLLIQPKVYRHPF : 106
 Cel-UNC-50 : MSSQPRGS---GTQFGS--CSPIQRMPREP--AESFTTSPGKSTYSTSTDRVGCITAVRMSAFAKLSRFTRRLVHTRQMDPFALWQMLYLLIQPKVYRHPF : 101
 B. malayi : ---NVHAGTSFTFASGGRRP---PSCYIISPGAKSITSMGSDIGCPTAVRMTAKLRYFRRLIEFRQMDPFALWQMLYLLIQPKVYRHPF : 93
 A. suum : ---SAGSSTFFFSPTGRTP---SANGYSPPGARSINSFS-ADRVGCTFAVRMSAGAKLRYFRRLIEFRQMDPEFALWQMLYLLIQPKVYRHPF : 92

AS12038

Hco-UNC-50 : YRRTKDQFARDDPAPLVLLSLSLIFSSVYFVALGDTWGFYFFLWVIFIDCIGVGLIVATILWMSIRFURKVCDDQVWKGYCFDVHLSNAFFPMLILLHVLLPIL : 214
 Cel-UNC-50 : YRRTKDQFARDDPAPLVLLLSLFLSSIFYAMALGKIKIGFTFZLMSVFVDCIGVGVVIATVLMWMSRERLKVCDQDVWKGYCFDVHLSNAFFPMLILLHVIVPIL : 209
 B. malayi : YRRTKDQWARDPAPLVLLLATALAVSSIEPLMTIELSPIGPIAPLAWVPIDCIWGLIATVLMWMSRERLRRVCDQDVWKGYCFDVHLSNAFFPMLILLHVLLPIL : 201
 A. suum : YRRTKDQWARDPAPLV---LCSFTGFIAFFLWVVFIDCIGVGLIVATVLM--AREYLRRYCDQDVWGCYCFDVHLSNAFFPMLILLHVLLPIL : 180

ED324617

ED324617

ED177719

TM1

TM2

TM3

TM4

TM5

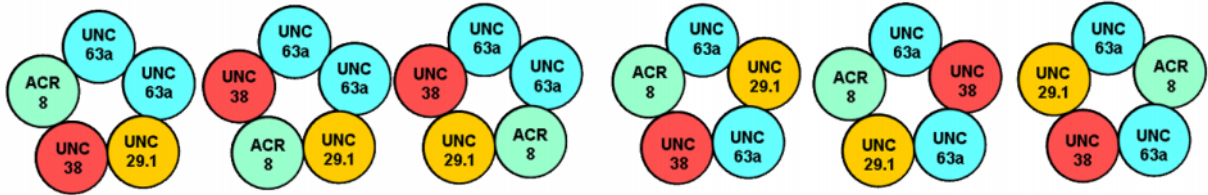
Hco-UNC-50 : YPTLVDSPFFLEFALGRTIMFIRAAYVYVITFLGYTALPILHRTOZFLYPMTFLZISNVATITAGWNISRSAMGFYHRVETDD----- : 298
 Cel-UNC-50 : YPTLIDSPAFLEFALGRTIMFIRAAVYVYITFLGYTALPILHKTOZFLYPISPISNFFVATLZGWNISRPTAMFYHSPAPPHKFAPOHGL : 301
 B. malayi : FSEHGFDAFLEFALGRTIMFVAVYVYITFLGYTALPILKNTHEFLYPISPFLHFTVAVTAGWNISRTAMDYHLSLENRRHRS----- : 288
 A. suum : YSEQLSS-----FILALPILKNTHEFLYPTFLZIFTVATVITAGWNISRTAMFYHFRAE----- : 234

ED273171

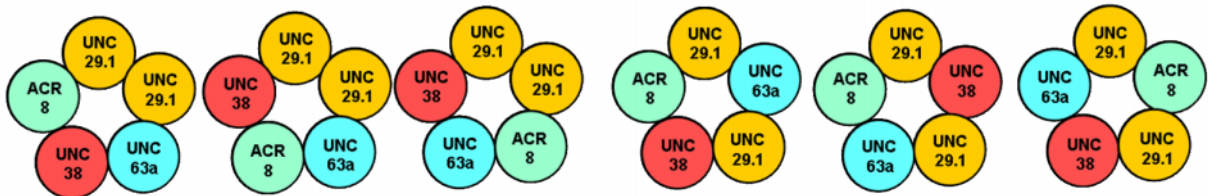
C

		Thioredoxin domain	
		ED247067	
Hco-UNC-74	: --MQYFDLILSVIPCCF--	AAQTIIIVVIDLNRKFLDVMNEGIV	VFYAPWCAHCKRIIPINEHLGHAVDKSLPVRVAKMDCTRFVSMLSISGYPTILPFR : 102
Cel-UNC-74	: MQKYFLLEILLSVILFYDTEATPPTAVLDLSDKPLDVKDEGNWV	FYAPWCAHCKRIIPVNEQVGHLESDSNLPVIRVKKLDCTRFPAVANKLSIQGYPTILPFR	: 108
B. malayi	: -----IINIVQ--	ATNIPSOVIELNDKPLQVKNDEG	VFYAPWCAHCKRIIPVNEQVGHLESDSNLPVIRVKKLDCTRVMTASALMREGYPTIIPFR : 92
A. suum	: -----	FYAPWCAHCKRIIPINEHVGHALDRSS	PVAVAKLDCTRYTFLASALMREGYPTIILY- : 58
		Thioredoxin domain	
		ED247067	
Hco-UNC-74	: QCRRLVTCRRSKEDLNFVVRKSSAPIEKINAMQMDIRRDSSDPSFV	IIGDEKDG---	VTKFBRIAGSLFSKTRRESASPASVPAFLRESG-ARVAVFKDDSF : 205
Cel-UNC-74	: MCHVIDYCCREKELVSPAKRCAPLIEVINENGLKVKLSAES	PSVVFESGGP---	LFDAMFMEASKFSVARFSTVAPPENDASER---CEVAVPKIMFE : 208
B. malayi	: NRENVVFEERRKKEAIIIDGAIKAAGVYGI	IBSTFOLSQMRKDLNEPFFVH	ENHDAQLLESFDYSDIAENLFSSTRFTRKRDVFRSWSILBIFSLVFKDGEY : 200
A. suum	: -----	-----	-----
Hco-UNC-74	: FPYHESVETESNIMABRNPLMPRASQWNLRDIAI	KLLLVIVTSNELERNQSTPVCRFYERKMRGAEDLRK	SQVLSMRYQPAMMDGSDIVSTIVMNMENADN--- : 309
Cel-UNC-74	: IEFNGDEERLTEMVTRERNPFLQAYSSNLA	EIGASKLVVVLVVSSESHKFNWTSPIRE	FHKTEERASKELRKHPDLNREQFAMLDGSDLASIQGLAVSEPH--- : 312
B. malayi	: LTYKREGSLSDMIHSEKMSLIPLISTNVKESRM	RLLVLYVWVVERNYTRVGKFFSLVTNVAAQWVREDSYLSNIF	QFGMLDGNELANNVILGTVNQPENIIA : 307
A. suum	: -----	-----	-----
		TM	
Hco-UNC-74	: -----	IIVLVYTTYEYFLMDDPEKVT	RCSLWVWLSMADGTERGATPLGGRSLLTRIRRIIFELYMNVVTFMFAQTPLLSSVDFGMPIAFLS : 397
Cel-UNC-74	: -----	LFIENYTSYEVYLSDDPSQMTIKSILTPLEQTS	EGIDKEHVAEFGGRHLLTRIKRMAFELYMNIQMFATQPLLLSSVDFGMPIAFLS : 400
B. malayi	: GRNVLVFADVPTVAVFLCLGLLV	FLVTSYEVYSSMVA	SVMRESLISPLERATIG---DVAFLGGRSISQRFKRICFE : 383
A. suum	: -----	-----	-----
Hco-UNC-74	: LICYSICSRDFSVDRSEFTPDDEEEVE	AGRESE	SALLVDQMERKME : 445
Cel-UNC-74	: LICYSICRADFTVDRDEPFGDEDELID	EGRETE	HPE-TDDEEKA : 447
B. malayi	: -----	ADPDS	AVLA : 392
A. suum	: -----	-----	-----

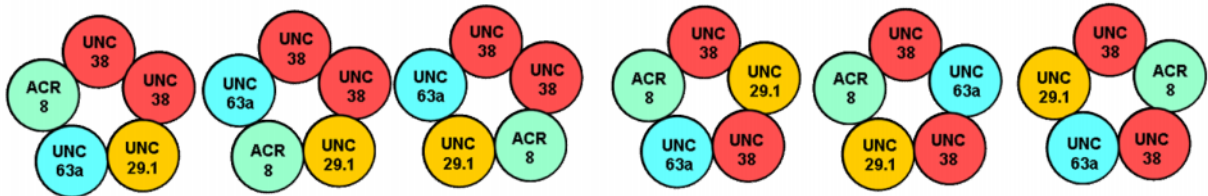
L-AChR1 1:1:1:2 (ACR-8, UNC-29.1, UNC-38, UNC-63a)



L-AChR1 1:2:1:1 (ACR-8, UNC-29.1, UNC-38, UNC-63a)



L-AChR1 1:1:2:1 (ACR-8, UNC-29.1, UNC-38, UNC-63a)



L-AChR1 2:1:1:1 (ACR-8, UNC-29.1, UNC-38, UNC-63a)

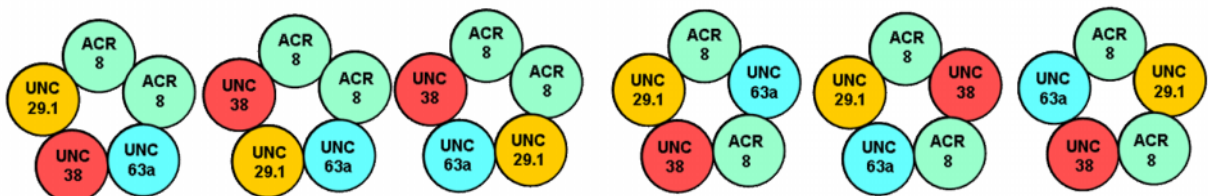


Figure 17 : Combinaisons possibles d'assemblage des sous-unités du L-AChR1. La sous-unité Hco-UNC-29.1 est représentée en jaune, Hco-UNC-38 en rouge, Hco-UNC63a en bleu et Hco-ACR-8 en verte.

Résultats / Discussion de l'article 4

Chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* la reconstitution du récepteur au lévamisole (L-AChR) fonctionnel nécessite 5 sous-unités différentes (LEV-1, LEV-8, UNC-29, UNC-38 & UNC-63) et 3 protéines accessoires (RIC-3, UNC-50 & UNC-74). La reconstitution de ce récepteur chez le nématode parasite *Haemonchus contortus* a révélé des différences remarquables avec celui de *C. elegans*.

- La reconstitution de 2 récepteurs sensibles au lévamisole :
 - Le L-AChR1 constitué des sous-unités Hco-UNC-38, Hco-UNC-63a, Hco-UNC-29.1 et Hco-ACR-8 qui est sensible à l'acétylcholine et au lévamisole (Figure 17).
 - Le L-AChR2 qui lui est constitué des sous-unités Hco-UNC-38, Hco-UNC-63a, Hco-UNC-29.1, est sensible à l'acétylcholine, le pyrantel et la nicotine (Figure 18).

- La sous-unité *Hco-lev-1* de *H. contortus* ne possède pas de peptide signal de sécrétion. Il est donc probable que la sous-unité Hco-LEV-1 ne possédant pas cette séquence ne soit pas adressée correctement et donc non incorporée au récepteur final. La reconstitution du récepteur *in vitro* confirme cette hypothèse puisque l'ajout ou non de l'ARNc de la sous-unité LEV-1 ne change pas les propriétés du récepteur. A l'inverse chez *C. elegans*, lorsque la sous-unité LEV-1 est supprimée, le récepteur devient non fonctionnel.

- Au cours de la comparaison de transcriptome d'isolats d'*H. contortus* sensibles et résistants au lévamisole, un fragment montrant une forte homologie avec la sous-unité *acr-8* d'AChR était spécifiquement exprimée chez les isolats résistants testés. Chez *C. elegans* le gène *acr-8* est proche de *lev-8* mais ne semble pas participer au L-AChR. Chez *H. contortus*, la forme pleine longueur du gène *Hco-acr-8* présente des signatures communes avec la sous-unité LEV-8 de *C. elegans*. Nous avons émis l'hypothèse de l'implication d'Hco-ACR-8 dans le récepteur au lévamisole d'*H. contortus*. La mise en évidence du rôle majeur de la sous-unité Hco-ACR-8 dans la sensibilité au lévamisole confirme donc clairement cette hypothèse.

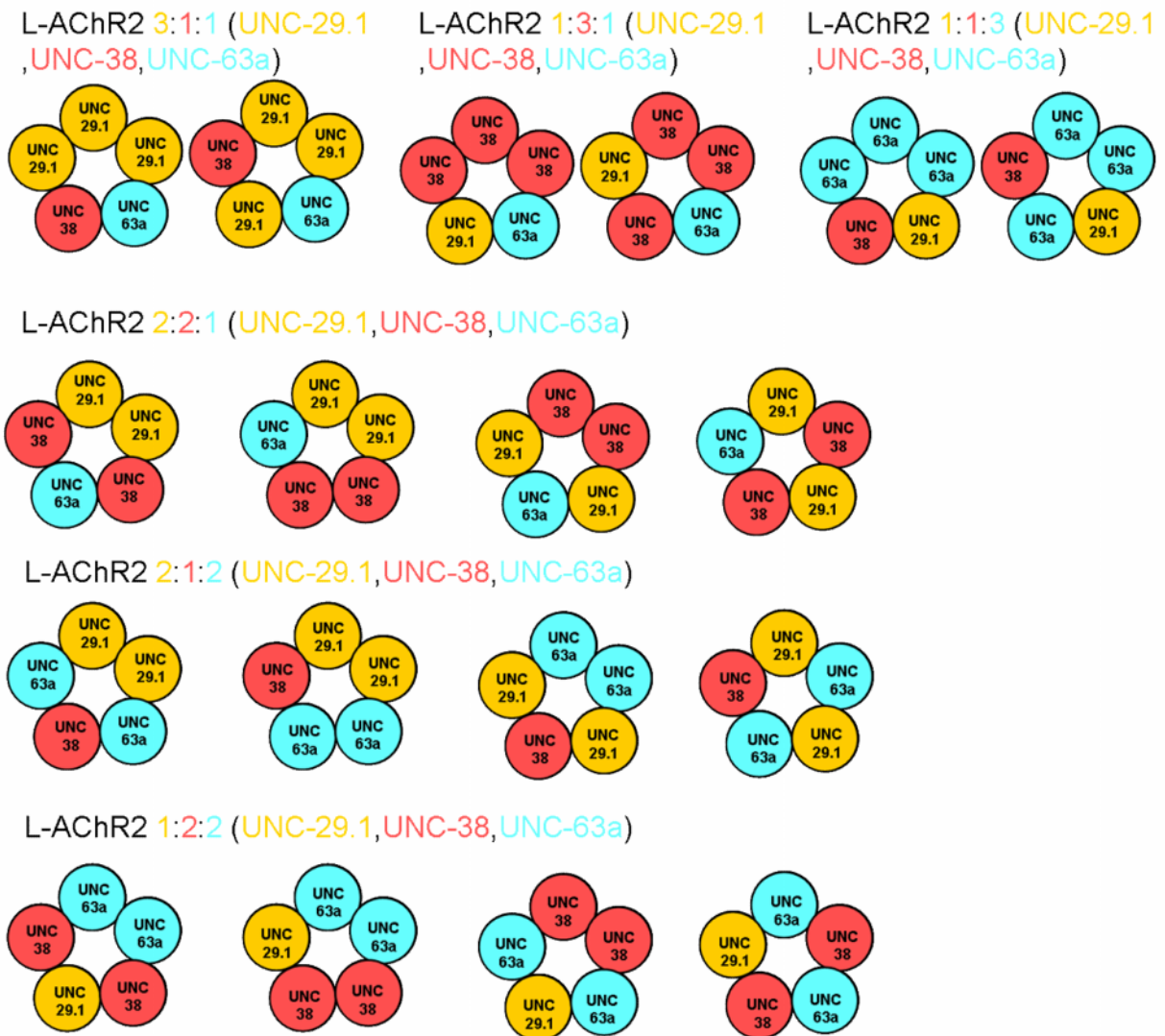


Figure 18 : Combinaisons possibles d'assemblage des sous-unités du L-AChR2. La sous-unité Hco-UNC-29.1 est représentée en jaune, Hco-UNC-38 en rouge, Hco-UNC63a en bleu.

Dans le cadre de ce travail nous avons démontré que :

- Les homologues des 3 protéines accessoires nécessaires à l'expression du L-AChR de *C. elegans* sont également nécessaires à l'expression du récepteur chez *H. contortus*.
- La co-expression de la forme pleine longueur et de la forme tronquée d'UNC-63 diminue fortement l'expression du récepteur. Ce mécanisme pourrait donc être à l'origine de la résistance au lévamisole chez l'isolat RHS6.

En conclusion, nos travaux de reconstitution de L-AChRs d'*H. contortus* en système hétérologue (œufs de xénope) constitue la première validation fonctionnelle d'un mécanisme moléculaire de résistance au lévamisole chez un nématode parasite.

DISCUSSION / PERSPECTIVES

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons identifié les sous-unités du récepteur au lévamisole (L-AChR) chez 3 espèces de strongles digestifs : *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. La complémentarité des approches gènes-candidats et transcriptomique (cDNA-AFLP) a permis de reconstituer, en œufs de xénope, 2 L-AChRs chez *H. contortus* : l'un préférentiellement sensible au lévamisole et l'autre au pyrantel. Dans cette partie, nous présenterons et discuterons des perspectives concernant la poursuite de l'étude sur les mécanismes de résistance au lévamisole chez les strongles digestifs.

1) La résistance au lévamisole

1.1) la recherche sans *a priori*

Les expériences de cDNA-AFLP nous ont permis de détecter deux marqueurs de résistance robuste (*hal7* & *Hco-acr-8b*). Cependant, les autres candidats étudiés se sont révélés être des faux positifs dû vraisemblablement à du polymorphisme populationnel. Des études ont montré que le nématode parasite *H. contortus* possède une forte hétérogénéité au niveau de son génome entre les différents isolats existants (Grant, 1994). Dans ce contexte, l'introgession des gènes de résistances chez un isolat sensible permettrait de palier à ce problème de variabilité intrapopulationnelle. Ce procédé, qui a pour but de diminuer la variabilité génétique entre 2 isolats, consiste à croiser sur plusieurs générations un isolat sensible et un isolat résistant au lévamisole avec un excès de vers issus de l'isolat sensible tout en maintenant la pression de sélection par des traitements au lévamisole. Ce processus a déjà été réalisé chez *H. contortus*, montrant une diminution de la variabilité génétique entre l'isolat obtenu et l'isolat de départ (Otsen *et al.*, 2001, Roos *et al.*, 2004). La comparaison du transcriptome de ces 2 isolats en cDNA-AFLP permettrait de réduire cette variabilité intrapopulationnelle naturelle et donc le nombre de faux positifs détectés.

1.2) Les autres gènes impliqués dans la résistance au lévamisole

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux gènes nécessaires à la reconstitution du L-AChR d'*H. contortus* en système hétérologue c'est-à-dire les sous-unités potentielles du L-AChR et les 3 protéines accessoires essentielles pour son expression *in vitro* (RIC-3, UNC-50, UNC-74). Cependant les études réalisées chez *C. elegans*, ont permis d'identifier d'autres gènes pouvant jouer un rôle dans le phénotype de résistance au lévamisole, comme les gènes *lev-9* et *lev-10* qui jouent un rôle dans l'agrégation du récepteur

au niveau de la jonction neuromusculaire (Lewis *et al.*, 1987a). La recherche d'homologues de ces autres gènes, puis de polymorphisme entre isolats sensibles et résistants au lévamisole chez nos nématodes parasites permettrait peut-être de détecter d'autres gènes impliqués dans le phénotype de résistance au lévamisole chez nos nématodes parasites.

1.3) Rôle des formes tronquées

Au cours de nos études des formes tronquées des transcrits des gènes codant les sous-unités UNC-63 et ACR-8 du L-AChR ont été identifiées chez des isolats résistants au lévamisole. Les reconstitutions de récepteur *in vitro* ont montré que, pour UNC-63, ces formes peuvent jouer un rôle de dominant négatif sur l'expression du récepteur en œufs de xénope. L'expression de L-AChRs à la fonctionnalité altérée *in vivo* pourrait expliquer le phénotype de résistance observé chez ces isolats.

La forme tronquée de la sous-unité Hco-ACR-8 est plus courte que celle d'Hco-UNC-63 et ne possède pas de domaine transmembranaire. Des études réalisées sur des récepteurs de *Torpedo* sp. ont montré que la présence de la partie N-terminale de la protéine ainsi que d'au moins un domaine transmembranaire est indispensable pour avoir l'effet dominant négatif sur le récepteur final (Sumikawa & Nishizaki, 1994). L'implication éventuelle de cette forme tronquée d'Hco-ACR-8 dans un mécanisme de résistance reste donc à élucider. Chez *C. elegans*, la production de formes tronquées d'un ARN donné avec un cadre ouvert de lecture court serait rapidement dégradée par la voie cellulaire NMD, permettrait de réguler négativement l'expression d'un gène (Zahler, 2005).

1.4) Stœchiométrie des sous-unités du L-AChR

Classiquement, les nAChRs sont composés de 5 sous-unités assemblées en pentamère. Chez *H. contortus*, nos études ont montré que le récepteur au lévamisole nécessite la combinaison de 4 sous-unités différentes et 3 pour le récepteur au pyrantel. Il est donc fort probable que chez *H. contortus*, une des sous-unités soit présente au moins 2 fois au sein du même récepteur. Il serait intéressant d'étudier quels sont les interactions entre les différentes sous-unités, ainsi que la place occupée par chacune d'elle dans le récepteur. De nouveaux moyens d'étude permettant de visualiser l'interaction entre 2 protéines sont disponibles (Duolink[®]) et permettraient de déterminer quelles sous-unités interagissent ensemble.

Ces informations pourraient également être exploitées dans le cadre de la recherche du site de fixation des différents ligands d'un récepteur. En effet, le site de fixation d'une molécule se

trouve à l'interface de 2 sous-unités contiguës. De plus, la sous-unité Hco-ACR-8 semble jouer un rôle important au niveau du site de fixation du lévamisole sur le récepteur. En effet, l'utilisation du système d'expression en œufs de xénope a permis de reconstituer 2 récepteurs différents : le premier préférentiellement sensible au lévamisole (L-AChR1) et le second au pyrantel (L-AChR2). La différence entre ces 2 récepteurs est la présence de la sous-unité Hco-ACR-8 dans le L-AChR1 alors que celle-ci est absente dans le L-AChR2. La sous-unité Hco-ACR-8 semble donc favoriser la fixation du lévamisole sur le L-AChR1. Afin de déterminer avec précision le site de fixation du lévamisole, des expériences de mutagenèse dirigée pourront être réalisées sur la partie correspondant au domaine extracellulaire de la sous-unité. Chez *C. elegans*, le motif YPGCC présent sur LEV-8 semble jouer un rôle dans la fixation du lévamisole (Towers *et al.*, 2006). Ce motif est également retrouvé sur les homologues de la sous unité ACR-8 chez nos 3 espèces parasites. Des expériences de mutagenèse dirigée sur ce motif de la sous-unité Hco-ACR-8, puis l'incorporation de cette sous-unité dans le L-AChR1 peut nous permettre de tester si l'affinité du récepteur pour le lévamisole est modifiée.

2) La fonction de la sous-unité Hco-ACR-8

Chez *C. elegans*, bien que les sous-unités LEV-8 et ACR-8 soient relativement conservées au niveau de leurs séquences protéiques, leur fonction semble être différente. En effet, la sous-unité LEV-8 participe au L-AChR et la sous-unité ACR-8 pourrait être incorporée dans un récepteur insensible au lévamisole (Touroutine *et al.*, 2005, Towers *et al.*, 2005). Chez les nématodes parasites, les recherches dans les banques de données ainsi que les expériences de biologie moléculaire n'ont pas permis de mettre en évidence d'homologue pour la sous-unité LEV-8 (Williamson *et al.*, 2007). Cependant l'homologue de la sous-unité ACR-8, chez les espèces parasites étudiées au laboratoire, possède des motifs protéiques spécifiquement retrouvés sur Cel-LEV-8. Cette constatation a été confirmée à partir de recherches bioinformatiques dans les banques de données partielles disponibles sur des espèces de nématodes parasites telles que: *Ancylostoma caninum* (clade V), *Globodera pallida* (clade IV), *Heterodera schachtii* (clade IV), *Oesophagostomum dentatum* (clade V), *Brugia malayi* (clade III), *Loa loa* (clade III) et *Trichinella spiralis* (clade I).

La reconstitution du L-AChR d'*H. contortus* en œufs de xénope a permis de montrer que la sous-unité Hco-ACR-8 est essentielle pour former ce récepteur *in vitro*. Il semble donc que la sous-unité Hco-ACR-8 d'*H. contortus* possède des propriétés similaires à la sous-unité LEV-8 de *C. elegans*. Dans ce contexte, des reconstitutions de récepteurs chimères peuvent

être réalisées en œufs de xénope. En effet, la co-expression des sous-unités UNC-38, UNC-63, UNC-29, LEV-1 de *C. elegans* avec la sous-unité Hco-ACR-8 d'*H. contortus* pourrait permettre de savoir si Hco-ACR-8 peut remplacer Cel-LEV-8 *in vitro*.

Afin de tester cette hypothèse également *in vivo*, des expériences de complémentation fonctionnelle avec Hco-ACR-8 pourront être réalisées chez *C. elegans*. Ce type d'expérience a déjà été réalisé pour le gène de la α -tubuline ou une protéase de type Cathepsine L d'*H. contortus* (Kwa *et al.*, 1995, Britton & Murray, 2002).

3) La reconstitution de récepteur en œufs de xénope

3.1) Poursuite de la caractérisation du L-AChR d'*Haemonchus contortus*

Dans ce travail, nous avons pu exprimer *in vitro* 2 L-AChRs du nématode parasite *H. contortus*. Cependant lors de la recherche des gènes codant des sous-unités susceptibles d'être incorporées au L-AChR, des divergences ont été mises en évidence par rapport au nématode modèle *C. elegans*.

- Chez les 3 espèces étudiées au laboratoire (*H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*), le gène *lev-1* code une protéine ne possédant pas de peptide signal de sécrétion. Ce peptide est essentiel à la protéine qui sans lui a une faible probabilité de se retrouver incorporée au récepteur final. Chez *C. elegans* la sous-unité LEV-1 est nécessaire à la reconstitution du L-AChR *in vitro*. Des expériences de co-localisation de la sous-unité Hco-LEV-1 et de Hco-ACR-8 à l'aide d'anticorps permettraient de vérifier l'incorporation de la sous-unité Hco-LEV-1 dans le L-AChR *in vivo*.

- Le nombre de copies du gène *unc-29* a été multiplié par 4 entre les nématodes *C. elegans* et *H. contortus*. Les séquences de ces 4 paralogues sont très conservées avec un minimum de 88% de similarité (séquence protéique), entre les 2 paralogues les plus éloignés. Des différences sont observées notamment le domaine extracellulaire de la sous-unité qui participe aux sites de fixation des différentes molécules. La reconstitution du L-AChR en testant les différentes copies du gène *unc-29* permettra de déterminer si elles changent la pharmacologie du récepteur.

3.2) Le L-AChR des parasites

Une phylogénie des nématodes basée sur la séquence de la petite sous-unité 18S du ribosome a permis de classer la diversité des espèces de nématodes en 5 clades. Notre étude

constitue la première reconstitution de L-AChRs chez un nématode parasite du clade V. Pour poursuivre ce travail, l'étude de la composition en sous-unités du L-AChR chez d'autres espèces de nématodes parasites est prévue. La reconstitution dans un premier temps des récepteurs de *T. colubriformis* et *T. circumcincta* devrait être facilement réalisable puisque nous disposons déjà des homologues des gènes utilisés chez *H. contortus*. De plus, ces espèces étant de la même famille (Strongyloidea) et donc très proches, il est probable que les données obtenues chez *H. contortus* soit transposables à ces deux espèces de strongles. De même, la reconstitution du L-AChR d'un nématode parasite du porc, appartenant également au clade V, est en cours au laboratoire chez le nématode *Oesophagostomum dentatum*.

Le récepteur au lévamisole du parasite *Ascaris suum* (clade III) a récemment été reconstitué en œufs de xénope. Cette reconstitution *in vitro* a nécessité la co-expression de seulement 2 sous-unités : Asu-UNC-29 et Asu-UNC-38. La modulation de la quantité de chaque sous-unité permet de modifier les propriétés pharmacologiques du récepteur obtenu (Williamson *et al.*, 2009). Cette reconstitution a été réalisée sans les homologues des protéines accessoires RIC-3, UNC-50, UNC-74 nécessitant d'importantes concentrations d'ARNc injecté dans l'œuf de xénope. La découverte dans les banques de données d'*A. suum* d'orthologues pour les sous-unités UNC-63 et ACR-8 et des protéines accessoires interpelle sur la composition du récepteur *in vivo*. Des essais de reconstitution du L-AChR d'*A. suum* à l'aide de toutes les protéines identifiées chez cette espèce pourront être réalisés afin de tester leurs fonctions.

3.3) Etude des récepteurs de parasites

L'expression de récepteurs de parasites en système hétérologue, comme en œufs de xénope, est un outil puissant pour l'étude *in vitro* de la fonctionnalité ainsi que des propriétés pharmacologiques d'un sous-type de récepteur donné. Cet outil offre clairement des perspectives pour la recherche de nouvelles molécules anthelminthiques.

La majorité des 29 sous-unités identifiées chez *C. elegans* n'a pas d'implication connue dans un récepteur donné. Chez nos strongles digestifs, la recherche d'homologues de ces sous-unités a montré que certaines d'entre elles sont dupliquées. De plus, chez *H. contortus*, d'autres sous-unités d'AChR ont été découvertes qui ne présentent pas d'homologie significative avec celle identifiée chez *C. elegans*. Il existe donc une variété de sous-unité de nAChR encore plus importante chez le nématode parasite *H. contortus* que chez le nématode libre *C. elegans*. Cela se traduit certainement par la présence de récepteurs spécifiques des

nématodes parasites. Un anthelminthique qui cible uniquement les nématodes parasites sans avoir d'effet négatif sur les nématodes libres du sol est très important. Dans certains cas, les molécules anthelminthiques sont excrétées par les animaux traités et se retrouvent dans le sol. Ces molécules peuvent avoir un impact négatif sur l'écosystème, c'est le cas par exemple de la plupart des molécules de la famille des lactones macrocycliques (Lumaret & Errouissi, 2002).

Aujourd'hui, le nématode *C. elegans* est en général utilisé pour cribler les molécules anthelminthiques (Simpkin & Coles, 1981). Cependant nos résultats concernant la reconstitution de L-AChR chez le nématode parasite *H. contortus* ont montré que les récepteurs des deux espèces possédaient des propriétés pharmacologiques différentes. Dans ce contexte, le développement de l'outil d'expression de récepteurs de nématodes parasites en œufs de xénope offre une alternative à l'utilisation de l'espèce *C. elegans*.

BIBLIOGRAPHIE

- Aceves J., Erlij D. & Martinez-Maranon R.** (1970). The mechanism of the paralyzing action of tetramisole on *Ascaris* somatic muscle. *British Journal of Pharmacology*, **38**, 602-607.
- Adoutte A., Balavoine G., Lartillot N. & de Rosa R.** (1999). Animal evolution. The end of the intermediate taxa? *Trends in Genetics*, **15**, 104-108.
- Albuquerque E. X., Pereira E. F., Alkondon M. & Rogers S. W.** (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, **89**, 73-120.
- Almedom R. B., Liewald J. F., Hernando G., Schultheis C., Rayes D., Pan J., Schedletzky T., Hutter H., Bouzat C. & Gottschalk A.** (2009). An ER-resident membrane protein complex regulates nicotinic acetylcholine receptor subunit composition at the synapse. *The EMBO Journal*, **28**, 2636-2649.
- Atchison W. D., Geary T. G., Manning B., Vandewaa E. A. & Thompson D. P.** (1992). Comparative neuromuscular blocking actions of levamisole and pyrantel-type anthelmintics on rat and gastrointestinal nematode somatic muscle. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **112**, 133-143.
- Aubry M. L., Cowell P., Davey M. J. & Shevde S.** (1970). Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic: pyrantel. *British Journal of Pharmacology*, **38**, 332-344.
- Bachem C. W., van der Hoeven R. S., de Bruijn S. M., Vreugdenhil D., Zabeau M. & Visser R. G.** (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*, **9**, 745-753.
- Bakker N., Vervelde L., Kanobana K., Knox D. P., Cornelissen A. W., de Vries E. & Yatsuda A. P.** (2004). Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine*, **22**, 618-628.
- Ballivet M., Alliod C., Bertrand S. & Bertrand D.** (1996). Nicotinic acetylcholine receptors in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, **258**, 261-269.
- Barger I. A. & Le Jambre L. F.** (1988). Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep: mortality of established worms. *International Journal for Parasitology*, **18**, 269-273.
- Barnard E. A., Coates V., Dolly J. O. & Mallick B.** (1977). Binding of α -bungarotoxin and cholinergic ligands to acetylcholine receptors in the membrane of skeletal muscle. *Cell Biology International Reports*, **1**, 99-106.
- Barth D. & Visser M.** (1991). Gastro-intestinal nematodes of cattle. Diagnostic atlas. In *Magen-Darminematoden des Rindes. Diagnostischer Atlas*. pp. iii + 105 pp. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart Germany.
- Bartos M., Rayes D. & Bouzat C.** (2006). Molecular determinants of pyrantel selectivity in nicotinic receptors. *Molecular Pharmacology*, **70**, 1307-1318.
- Bartos M., Price K. L., Lummis S. C. & Bouzat C.** (2009). Glutamine 57 at the complementary binding site face is a key determinant of morantel selectivity for $\alpha 7$ nicotinic receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 21478-21487.
- Bauer C., Merkt J. C., Janke-Grimm G. & Bürger H. J.** (1986). Prevalence and control of benzimidazole-resistant small strongyles on German thoroughbred studs. *Veterinary Parasitology*, **21**, 189-203.

- Baylis H. A., Matsuda K., Squire M. D., Fleming J. T., Harvey R. J., Darlison M. G., Barnard E. A. & Sattelle D. B.** (1997). ACR-3, a *Caenorhabditis elegans* nicotinic acetylcholine receptor subunit. Molecular cloning and functional expression. *Receptors Channels*, **5**, 149-158.
- Beech R. N., Prichard R. K. & Scott M. E.** (1994). Genetic Variability of the α -Tubulin Genes in Benzimidazole-Susceptible and α -Resistant Strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics*, **138**, 103-110.
- Beech R. N., Levitt N., Cambos M., Zhou S. & Forrester S. G.** (2010a). Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **171**, 74-80.
- Beech R. N., Wolstenholme A. J., Neveu C. & Dent J. A.** (2010b). Nematode parasite genes: what's in a name? *Trends in Parasitology*, **26**, 334-340.
- Beg A. A. & Jorgensen E. M.** (2003). EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nature Neuroscience*, **6**, 1145-1152.
- Benian G. M., L'Hernault S. W. & Morris M. E.** (1993). Additional sequence complexity in the muscle gene, *unc-22*, and its encoded protein, twitchin, of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **134**, 1097-1104.
- Bennett M. R.** (2000). The concept of transmitter receptors: 100 years on. *Neuropharmacology*, **39**, 523-546.
- Beugnet F., Kerboeuf D., Nicolle J. C. & Soubieux D.** (1996). Use of free living stages to study the effects of thiabendazole, levamisole, pyrantel and ivermectin on the fine structure of *Haemonchus contortus* and *Heligmosomoides polygyrus*. *Veterinary Parasitology*, **63**, 83-94.
- Bianchi L. & Driscoll M.** (2006). Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook*, 1-16.
- Blackhall W. J., Liu H. Y., Xu M., Prichard R. K. & Beech R. N.** (1998). Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **95**, 193-201.
- Blackhall W. J., Prichard R. K. & Beech R. N.** (2008). P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Veterinary Parasitology*, **152**, 101-107.
- Blaxter M.** (1998). *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science*, **282**, 2041-2046.
- Blaxter M. L., De Ley P., Garey J. R., Liu L. X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J. R., Mackey L. Y., Dorris M., Frisse L. M., Vida J. T. & Thomas W. K.** (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*, **392**, 71-75.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 18590-18595.
- Bown M. D., Poppi D. P. & Sykes A. R.** (1991). The effect of post-ruminal infusion of protein or energy on the pathophysiology of *Trichostrongylus colubriformis* infestation and body composition in lambs. *Australian Journal of Agricultural Research*, **42**, 253-267.
- Britt D. P.** (1982). Benzimidazole-resistant nematodes in Britain. *Veterinary Record*, **110**, 343-344.

- Britton C. & Murray L.** (2002). A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **122**, 21-33.
- Brownlee D. J., Holden-Dye L. & Walker R. J.** (1997). Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology*, **115 (Pt 5)**, 553-561.
- Cabaret J., Bouilhol M. & Mage C.** (2002). Managing helminths of ruminants in organic farming. *Veterinary Research*, **33**, 625-640.
- Cabaret J.** (2004). Parasitisme helminthique en élevage biologique ovin : réalités et moyens de contrôle. *INRA Productions Animales*, **17**, 145-154.
- Campbell W. C., Fisher M. H., Stapley E. O., Albers-Schonberg G. & Jacob T. A.** (1983). Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, **221**, 823-828.
- Carmichael I., Visser R., Schneider D. & Soll M.** (1987). *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin. *Journal of the South African Veterinary Association*, **58**, 93.
- Cezar A. S., Toscan G., Camillo G., Sangioni L. A., Ribas H. O. & Vogel F. S.** (2010). Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*, **173**, 157-160.
- Changeux J. P., Kasai M. & Lee C. Y.** (1970). Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **67**, 1241-1247.
- Changeux J. P., Devillers-Thiery A. & Chemouilli P.** (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science*, **225**, 1335-1345.
- Changeux J. P. & Edelstein S. J.** (2005). Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science*, **308**, 1424-1428.
- Chartier C. & Reche B.** (1992). Gastrointestinal helminths and lungworms of French dairy goats: prevalence and geographical distribution in Poitou-Charentes. *Veterinary Research Communications*, **16**, 327-335.
- Clark C. H., Kiesel G. K. & Goby C. H.** (1962). Measurements of blood loss caused by *Haemonchus contortus* infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, **23**, 977-980.
- Cleo L. C., Michelle L. M., Jan B. & Wim van den B.** (2009). The nicotinic acetylcholine receptor partial agonist varenicline and the treatment of drug dependence: A review. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, **20**, 69-79.
- Cohen Ben-Ami H., Biala Y., Farah H., Elishevitz E., Battat E. & Treinin M.** (2009). Receptor and subunit specific interactions of RIC-3 with nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry*, **48**, 12329-12336.
- Cohen J. B., Weber M., Huchet M. & Changeux J. P.** (1972). Purification from *Torpedo marmorata* electric tissue of membrane fragments particularly rich in cholinergic receptor protein. *FEBS Letters*, **26**, 43-47.
- Coles G. C., East J. M. & Jenkins S. N.** (1975). Mechanism of action of anthelmintic levamisole. *General Pharmacology*, **6**, 309-313.

- Conder G. A., Thompson D. P. & Johnson S. S.** (1993). Demonstration of co-resistance of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin. *Veterinary Record*, **132**, 651-652.
- Conway D. P.** (1964). Variance in the Effectiveness of Thiabendazole against *Haemonchus contortus* in Sheep. *American Journal of Veterinary Research*, **25**, 844-846.
- Coop R. L. & Holmes P. H.** (1996). Nutrition and parasite interaction. *International Journal for Parasitology*, **26**, 951-962.
- Cornwell R. L.** (1966). Controlled laboratory trials in sheep with the anthelmintic pyrantel tartrate. *Veterinary Record*, **79**, 590-595.
- Cornwell R. L. & Jones R. M.** (1970). Controlled laboratory trials in sheep with the anthelmintic morantel. *The British Veterinary Journal*, **126**, 142-148.
- Coyne M. J., Smith G. & Johnstone C.** (1991). A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in sheep following experimental infections. *International Journal for Parasitology*, **21**, 847-853.
- Crompton D. W.** (1999). How much human helminthiasis is there in the world? *The Journal of Parasitology*, **85**, 397-403.
- Culetto E., Baylis H. A., Richmond J. E., Jones A. K., Fleming J. T., Squire M. D., Lewis J. A. & Sattelle D. B.** (2004). The *Caenorhabditis elegans unc-63* gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 42476-42483.
- Cully D. F., Vassilatis D. K., Liu K. K., Paress P. S., Van der Ploeg L. H., Schaeffer J. M. & Arena J. P.** (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **371**, 707-711.
- Davies P. A., Wang W., Hales T. G. & Kirkness E. F.** (2003). A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn^{2+} . *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 712-717.
- de Lourdes Mottier M. & Prichard R. K.** (2008). Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenetics and Genomics*, **18**, 129-140.
- Delany N. S., Laughton D. L. & Wolstenholme A. J.** (1998). Cloning and localisation of an avermectin receptor-related subunit from *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **97**, 177-187.
- Dent J. A., Davis M. W. & Avery L.** (1997). *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, **16**, 5867-5879.
- Dent J. A., Smith M. M., Vassilatis D. K. & Avery L.** (2000). The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 2674-2679.
- Dopazo H. & Dopazo J.** (2005). Genome-scale evidence of the nematode-arthropod clade. *Genome Biology*, **6**, R41.
- Dopheide T. A., Tachedjian M., Phillips C., Frenkel M. J., Wagland B. M. & Ward C. W.** (1991). Molecular characterisation of a protective, 11-kDa excretory-secretory protein from the parasitic stages of *Trichostrongylus colubriformis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **45**, 101-107.

- Dorris M., De Ley P. & Blaxter M. L.** (1999). Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology Today*, **15**, 188-193.
- Drudge J. H., Leland S. E., Jr. & Wyant Z. N.** (1957). Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. I. Studies of mixed infections in experimental animals. *American Journal of Veterinary Research*, **18**, 133-141.
- Eimer S., Gottschalk A., Hengartner M., Horvitz H. R., Richmond J., Schafer W. R. & Bessereau J. L.** (2007). Regulation of nicotinic receptor trafficking by the transmembrane Golgi protein UNC-50. *The EMBO Journal*, **26**, 4313-4323.
- Elard L., Comes A. M. & Humbert J. F.** (1996). Sequences of α -tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **79**, 249-253.
- Etter E., Hoste H., Chartier C., Pors I., Koch C., Broqua C. & Coutineau H.** (2000). The effect of two levels of dietary protein on resistance and resilience of dairy goats experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*: comparison between high and low producers. *Veterinary Research*, **31**, 247-258.
- Eysker M., Bakker N., Kooyman F. N., van der Linden D., Schrama C. & Ploeger H. W.** (2005). Consequences of the unusually warm and dry summer of 2003 in The Netherlands: poor development of free living stages, normal survival of infective larvae and long survival of adult gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology*, **133**, 313-321.
- Feitelson J. S., Payne J. & Kim L.** (1992). *Bacillus thuringiensis* : insects and beyond. *Bio-Technology*, **10**, 271-275.
- Fertuck H. C. & Salpeter M. M.** (1974). Localization of acetylcholine receptor by ^{125}I -labeled α -bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**, 1376-1378.
- Fleming J. T., Squire M. D., Barnes T. M., Tornoe C., Matsuda K., Ahnn J., Fire A., Sulston J. E., Barnard E. A., Sattelle D. B. & Lewis J. A.** (1997). *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *The Journal of Neuroscience*, **17**, 5843-5857.
- Forrester S. G., Hamdan F. F., Prichard R. K. & Beech R. N.** (1999). Cloning, sequencing, and developmental expression levels of a novel glutamate-gated chloride channel homologue in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **254**, 529-534.
- Fox M. T.** (1997). Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology*, **72**, 285-297; discussion 297-308.
- Fujita N., Nelson N., Fox T. D., Claudio T., Lindstrom J., Riezman H. & Hess G. P.** (1986). Biosynthesis of the *Torpedo californica* acetylcholine receptor α subunit in yeast. *Science*, **231**, 1284-1287.
- Gally C. & Bessereau J. L.** (2003). *C. elegans* : des neurones et des gènes. *M S-Medecine Sciences*, **19**, 725-734.
- Gally C., Eimer S., Richmond J. E. & Bessereau J. L.** (2004). A transmembrane protein required for acetylcholine receptor clustering in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **431**, 578-582.

- Geary T. G., Sims S. M., Thomas E. M., Vanover L., Davis J. P., Winterrowd C. A., Klein R. D., Ho N. F. & Thompson D. P.** (1993). *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology*, **77**, 88-96.
- Gendrel M., Rapti G., Richmond J. E. & Bessereau J. L.** (2009). A secreted complement-control-related protein ensures acetylcholine receptor clustering. *Nature*, **461**, 992-996.
- Gershoni J. M.** (1987). Expression of the α -bungarotoxin binding site of the nicotinic acetylcholine receptor by *Escherichia coli* transformants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 4318-4321.
- Ghisi M., Kaminsky R. & Maser P.** (2007). Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, **144**, 313-320.
- Gill J. H., Kerr C. A., Shoop W. L. & Lacey E.** (1998). Evidence of multiple mechanisms of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*--comparison of selection protocols. *International Journal for Parasitology*, **28**, 783-789.
- Gisselmann G., Pusch H., Hovemann B. T. & Hatt H.** (2002). Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nature Neuroscience*, **5**, 11-12.
- Gopal R. M., Pomroy W. E. & West D. M.** (1999). Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. *International Journal for Parasitology*, **29**, 781-786.
- Gordon H. M.** (1939). The anthelmintic efficiency of Phenothiazine. *Australian Veterinary Journal*, **15**, 245-251.
- Gottschalk A., Almedom R. B., Schedletzky T., Anderson S. D., Yates J. R., 3rd & Schafer W. R.** (2005). Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, **24**, 2566-2578.
- Grant W. N.** (1994). Genetic variation in parasitic nematodes and its implications. *International Journal for Parasitology*, **24**, 821-830.
- Grauso M., Reenan R. A., Culetto E. & Sattelle D. B.** (2002). Novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunit genes, *D 5*, *D 6* and *D 7*, in *Drosophila melanogaster* identify a new and highly conserved target of adenosine deaminase acting on RNA-mediated A-to-I pre-mRNA editing. *Genetics*, **160**, 1519-1533.
- Green W. N. & Wanamaker C. P.** (1997). The Role of the Cystine Loop in Acetylcholine Receptor Assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 20945-20953.
- Grenningloh G., Rienitz A., Schmitt B., Methfessel C., Zensen M., Beyreuther K., Gundelfinger E. D. & Betz H.** (1987). The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature*, **328**, 215-220.
- Guilhon J.** (1966). Action d'un dérivé de l'imidazothiazole (Tétramisole) sur les Strongylides gastro-intestinaux des ovins. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*, **39**, 255-264.
- Halevi S., McKay J., Palfreyman M., Yassin L., Eshel M., Jorgensen E. & Treinin M.** (2002). The *C. elegans ric-3* gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *The EMBO Journal*, **21**, 1012-1020.
- Halevi S., Yassin L., Eshel M., Sala F., Sala S., Criado M. & Treinin M.** (2003). Conservation within the RIC-3 gene family. Effectors of mammalian nicotinic acetylcholine receptor expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 34411-34417.

- Haq S. K., Atif S. M. & Khan R. H.** (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **431**, 145-159.
- Harrow I. D. & Gratton K. A. F.** (1985). mode of action of the anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole on muscle cell membrane of the nematode *Ascaris suum*. *Pesticide Science*, **16**, 662-672.
- Haugstetter J., Blicher T. & Ellgaard L.** (2005). Identification and characterization of a novel thioredoxin-related transmembrane protein of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 8371-8380.
- Hermans-Borgmeyer I., Zopf D., Ryseck R. P., Hovemann B., Betz H. & Gundelfinger E. D.** (1986). Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from *Drosophila*. *The EMBO Journal*, **5**, 1503-1508.
- Hertzberg H., Huwyler U., Kohler L., Rehbein S. & Wanner M.** (2002). Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*, **125**, 65-70.
- Hoekstra R., Borgsteede F. H., Boersema J. H. & Roos M. H.** (1997a). Selection for high levamisole resistance in *Haemonchus contortus* monitored with an egg-hatch assay. *International Journal for Parasitology*, **27**, 1395-1400.
- Hoekstra R., Visser A., Wiley L. J., Weiss A. S., Sangster N. C. & Roos M. H.** (1997b). Characterization of an acetylcholine receptor gene of *Haemonchus contortus* in relation to levamisole resistance. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **84**, 179-187.
- Hopfield J. F., Tank D. W., Greengard P. & Huganir R. L.** (1988). Functional modulation of the nicotinic acetylcholine receptor by tyrosine phosphorylation. *Nature*, **336**, 677-680.
- Horton R. J.** (1990). Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitology Today*, **6**, 106-106.
- Hosking B., Kaminsky R., Sager H., Rolfe P. & Seewald W.** (2010). A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*, **106**, 529-532.
- Hotson I. K., Campbell N. J. & Smeal M. G.** (1970). Anthelmintic resistance in *Trichostrongylus colubriformis*. *Australian Veterinary Journal*, **46**, 356-360.
- Hu Y., Platzer E. G., Bellier A. & Aroian R. V.** (2010). Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 5955-5960.
- Hugot J. P., Baujard P. & Morand S.** (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, **3**, 199-208.
- Jackson F., Jackson E. & Coop R. L.** (1992). Evidence of multiple anthelmintic resistance in a strain of *Teladorsagia circumcincta* (*Ostertagia circumcincta*) isolated from goats in Scotland. *Research in Veterinary Science*, **53**, 371-374.
- Jin Y., Tian N., Cao J., Liang J., Yang Z. & Lv J.** (2007). RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit $\alpha 6$ transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 98.
- Jones A., Buckingham S., Brown L. & Sattelle D.** (2009). Alternative splicing of the *Anopheles gambiae* nicotinic acetylcholine receptor, *Agam* $\alpha 9$, generates both alpha and beta subunits. *Invertebrate Neuroscience*, **9**, 77-84.

- Jones A. K. & Sattelle D. B.** (2004). Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *BioEssays*, **26**, 39-49.
- Jones A. K., Buckingham S. D. & Sattelle D. B.** (2005). Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **4**, 321-330.
- Jones A. K., Raymond-Delpech V., Thany S. H., Gauthier M. & Sattelle D. B.** (2006). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Research*, **16**, 1422-1430.
- Jones A. K., Davis P., Hodgkin J. & Sattelle D. B.** (2007). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode *Caenorhabditis elegans*: an update on nomenclature. *Invertebrate Neuroscience*, **7**, 129-131.
- Jones A. K. & Sattelle D. B.** (2010). Diversity of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Vol. 683 pp. 25-43. Springer-Verlag Berlin, Berlin.
- Jospin M., Qi Y. B., Stawicki T. M., Boulin T., Schuske K. R., Horvitz H. R., Bessereau J. L., Jorgensen E. M. & Jin Y.** (2009). A neuronal acetylcholine receptor regulates the balance of muscle excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology*, **7**, e1000265.
- Kagawa H., Takuwa K. & Sakube Y.** (1997). Mutations and expressions of the tropomyosin gene and the troponin C gene of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Structure and Function*, **22**, 213-218.
- Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M. & Tzartos S. J.** (2007). Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Journal*, **274**, 3799-3845.
- Kaminsky R., Ducray P., Jung M., Clover R., Rufener L., Bouvier J., Weber S. S., Wenger A., Wieland-Berghausen S., Goebel T., Gauvry N., Pautrat F., Skripsky T., Froelich O., Komoin-Oka C., Westlund B., Sluder A. & Maser P.** (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, **452**, 176-180.
- Kao P. N. & Karlin A.** (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**, 8085-8088.
- Kaplan R. M.** (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, **20**, 477-481.
- Karlin A.** (2002). Emerging structure of the Nicotinic Acetylcholine receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, **3**, 102-114.
- Kass I. S., Wang C. C., Walrond J. P. & Stretton A. O.** (1980). Avermectin B_{1a}, a paralyzing anthelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in *Ascaris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77**, 6211-6215.
- Khakh B. S., Proctor W. R., Dunwiddie T. V., Labarca C. & Lester H. A.** (1999). Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels. *The Journal of Neuroscience*, **19**, 7289-7299.
- Knox D. P., Redmond D. L., Newlands G. F., Skuce P. J., Pettit D. & Smith W. D.** (2003). The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus*

contortus and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology*, **33**, 1129-1137.

Knox M. R., Josh P. F. & Anderson L. J. (2002). Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system: dispersal, persistence, and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. *Biological Control*, **24**, 176-182.

Kopp S. R., Coleman G. T., Traub R. J., McCarthy J. S. & Kotze A. C. (2009). Acetylcholine receptor subunit genes from *Ancylostoma caninum*: altered transcription patterns associated with pyrantel resistance. *International Journal for Parasitology*, **39**, 435-441.

Kotze A. C., O'Grady J., Gough J. M., Pearson R., Bagnall N. H., Kemp D. H. & Akhurst R. J. (2005). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, **35**, 1013-1022.

Krause R. M., Buisson B., Bertrand S., Corringier P. J., Galzi J. L., Changeux J. P. & Bertrand D. (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular Pharmacology*, **53**, 283-294.

Kwa M. S., Kooyman F. N. J., Boersema J. H. & Roos M. H. (1993). Effect of Selection for Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus* on α -Tubulin Isotype 1 and Isotype 2 Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **191**, 413-419.

Kwa M. S., Veenstra J. G. & Roos M. H. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in α -tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **63**, 299-303.

Kwa M. S., Veenstra J. G., Van Dijk M. & Roos M. H. (1995). α -tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, **246**, 500-510.

Lacey E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, **6**, 112-115.

Langley J. N. (1907). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *The Journal of Physiology*, **36**, 347-384.

Lansdell S. J. & Millar N. S. (2000). Cloning and heterologous expression of D 4, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology*, **39**, 2604-2614.

Lanusse C. E. & Prichard R. K. (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, **49**, 123-158.

Larsen M., Faedo M., Waller P. J. & Hennessy D. R. (1998). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: studies with *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*, **76**, 121-128.

Laughton D. L., Lunt G. G. & Wolstenholme A. J. (1997). Reporter gene constructs suggest that the *Caenorhabditis elegans* avermectin receptor α -subunit is expressed solely in the pharynx. *The Journal of Experimental Biology*, **200**, 1509-1514.

Lewis J. A., Wu C. H., Berg H. & Levine J. H. (1980a). The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **95**, 905-928.

Lewis J. A., Wu C. H., Levine J. H. & Berg H. (1980b). Levamisole-resistant mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neuroscience*, **5**, 967-989.

- Lewis J. A., Elmer J. S., Skimming J., McLafferty S., Fleming J. & McGee T.** (1987a). Cholinergic receptor mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*, **7**, 3059-3071.
- Lewis J. A., Fleming J. T., McLafferty S., Murphy H. & Wu C.** (1987b). The levamisole receptor, a cholinergic receptor of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Pharmacology*, **31**, 185-193.
- Lilley C. J., Atkinson H. J. & Urwin P. E.** (2005). Molecular aspects of cyst nematodes. *Molecular Plant Pathology*, **6**, 577-588.
- Lumaret J. P. & Errouissi F.** (2002). Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Veterinary Research*, **33**, 547-562.
- Maingi N., Bjorn H., Thamsborg S. M., Bogh H. O. & Nansen P.** (1996). A survey of anthelmintic resistance in nematode parasites of goats in Denmark. *Veterinary Parasitology*, **66**, 53-66.
- Maricq A. V., Peterson A. S., Brake A. J., Myers R. M. & Julius D.** (1991). Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science*, **254**, 432-437.
- Martin R. J. & Pennington A. J.** (1989). A patch-clamp study of effects of dihydroavermectin on *Ascaris* muscle. *British Journal of Pharmacology*, **98**, 747-756.
- Martin R. J.** (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, **154**, 11-34.
- Martin R. J., Robertson A. P. & Bjorn H.** (1997). Target sites of anthelmintics. *Parasitology*, **114 Suppl**, S111-124.
- Martin R. J. & Robertson A. P.** (2007). Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology*, **134**, 1093-1104.
- Maryon E. B., Coronado R. & Anderson P.** (1996). *unc-68* encodes a ryanodine receptor involved in regulating *C. elegans* body-wall muscle contraction. *The Journal of Cell Biology*, **134**, 885-893.
- McCavera S., Rogers A. T., Yates D. M., Woods D. J. & Wolstenholme A. J.** (2009). An ivermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Pharmacology*, **75**, 1347-1355.
- McIntire S. L., Jorgensen E., Kaplan J. & Horvitz H. R.** (1993). The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **364**, 337-341.
- McKay J. P., Raizen D. M., Gottschalk A., Schafer W. R. & Avery L.** (2004). *eat-2* and *eat-18* are required for nicotinic neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Genetics*, **166**, 161-169.
- Mendoza-De Gives P. & Vazquez-Prats V. M.** (1994). Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Veterinary Parasitology*, **55**, 197-203.
- Mesel I. d., Derycke S., Moens T., Gucht K. v. d., Vincx M. & Swings J.** (2004). Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. *Environmental Microbiology*, **6**, 733-744.
- Miledi R., Parker I. & Sumikawa K.** (1982). Properties of acetylcholine receptors translated by cat muscle mRNA in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, **1**, 1307-1312.

- Millar N. S. & Denholm I.** (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, **7**, 53-66.
- Millar N. S.** (2008). RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone. *British Journal of Pharmacology*, **153 Suppl 1**, S177-183.
- Millar N. S. & Gotti C.** (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, **56**, 237-246.
- Mishina M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi T., Kuno M. & Numa S.** (1984). Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature*, **307**, 604-608.
- Mitreva M., Blaxter M. L., Bird D. M. & McCarter J. P.** (2005). Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics*, **21**, 573-581.
- Molento M. B. & Prichard R. K.** (1999). Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus*; in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitology Research*, **85**, 1007-1011.
- Money T., Reader S., Qu L. J., Dunford R. P. & Moore G.** (1996). AFLP-based mRNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **24**, 2616-2617.
- Mongan N. P., Baylis H. A., Adcock C., Smith G. R., Sansom M. S. & Sattelle D. B.** (1998). An extensive and diverse gene family of nicotinic acetylcholine receptor subunits in *Caenorhabditis elegans*. *Receptors Channels*, **6**, 213-228.
- Mongan N. P., Jones A. K., Smith G. R., Sansom M. S. & Sattelle D. B.** (2002). Novel 7-like nicotinic acetylcholine receptor subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Protein Science*, **11**, 1162-1171.
- Montresor A., Crompton D. W. T., Gyorkos T. W. & Savioli L.** (2002). Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes. In *Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes* pp. viii + 64 pp. World Health Organization, Geneva Switzerland.
- Murray L., Geldhof P., Clark D., Knox D. P. & Britton C.** (2007). Expression and purification of an active cysteine protease of *Haemonchus contortus* using *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*, **37**, 1117-1125.
- Neveu-Lemaire M.** (1936). *Traité d'Helminthologie Médicale et Vétérinaire*, Vigot Frères, Paris.
- Nguyen M., Alfonso A., Johnson C. D. & Rand J. B.** (1995). *Caenorhabditis elegans* mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. *Genetics*, **140**, 527-535.
- Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T. & Numa S.** (1982). Primary structure of α -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature*, **299**, 793-797.
- Noda M., Furutani Y., Takahashi H., Toyosato M., Tanabe T., Shimizu S., Kikuyotani S., Kayano T., Hirose T., Inayama S. & Numa S.** (1983). Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding α -subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature*, **305**, 818-823.
- O'Connor L. J., Walkden-Brown S. W. & Kahn L. P.** (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, **142**, 1-15.

- O'Donnell I. J., Dineen J. K., Wagland B. M., Letho S., Dopheide T. A., Grant W. N. & Ward C. W.** (1989). Characterization of the major immunogen in the excretory-secretory products of exsheathed third-stage larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology*, **19**, 793-802.
- Otsen M., Hoekstra R., Plas M. E., Buntjer J. B., Lenstra J. A. & Roos M. H.** (2001). Amplified fragment length polymorphism analysis of genetic diversity of *Haemonchus contortus* during selection for drug resistance. *International Journal for Parasitology*, **31**, 1138-1143.
- Palcý C., Silvestre A., Sauve C., Cortet J. & Cabaret J.** (2010). Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: Long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *The Veterinary Journal*, **183**, 68-74.
- Pemberton D. J., Franks C. J., Walker R. J. & Holden-Dye L.** (2001). Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl- 2 in the function of the native receptor. *Molecular Pharmacology*, **59**, 1037-1043.
- Poppi D. P., Sykes A. R. & Dynes R. A.** (1990). The effect of endoparasitism on host nutrition - the implications for nutrient manipulation. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, **50**, 237-243.
- Portillo V., Jagannathan S. & Wolstenholme A. J.** (2003). Distribution of glutamate-gated chloride channel subunits in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *The Journal of Comparative Neurology*, **462**, 213-222.
- Prichard R.** (2001). Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*, **17**, 445-453.
- Puttachary S., Robertson A. P., Clark C. L. & Martin R. J.** (2010). Levamisole and ryanodine receptors. II: An electrophysiological study in *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **171**, 8-16.
- Qian H., Robertson A. P., Powell-Coffman J. A. & Martin R. J.** (2008). Levamisole resistance resolved at the single-channel level in *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB Journal*, **22**, 3247-3254.
- Qin L., Overmars H., Helder J., Popeijus H., van der Voort J. R., Groenink W., van Koert P., Schots A., Bakker J. & Smant G.** (2000). An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 830-836.
- Ranganathan R., Cannon S. C. & Horvitz H. R.** (2000). MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature*, **408**, 470-475.
- Rapti G., Richmond J. & Bessereau J.-L.** (2011). A single immunoglobulin-domain protein required for clustering acetylcholine receptors in *C. elegans*. *The EMBO Journal*, **30**, 706-718.
- Rayes D., De Rosa M. J., Bartos M. & Bouzat C.** (2004). Molecular basis of the differential sensitivity of nematode and mammalian muscle to the anthelmintic agent levamisole. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 36372-36381.
- Raymond V., Mongan N. P. & Sattelle D. B.** (2000). Anthelmintic actions on homomer-forming nicotinic acetylcholine receptor subunits: chicken $\alpha 7$ and ACR-16 from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience*, **101**, 785-791.

- Raymond V. & Sattelle D. B.** (2002). Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **1**, 427-436.
- Robertson A. P., Bjorn H. E. & Martin R. J.** (1999). Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. *The FASEB Journal*, **13**, 749-760.
- Robertson A. P., Bjorn H. E. & Martin R. J.** (2000). Pyrantel resistance alters nematode nicotinic acetylcholine receptor single-channel properties. *European Journal of Pharmacology*, **394**, 1-8.
- Robertson A. P., Clark C. L., Burns T. A., Thompson D. P., Geary T. G., Trailovic S. M. & Martin R. J.** (2002). Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **302**, 853-860.
- Robertson A. P., Clark C. L. & Martin R. J.** (2010). Levamisole and ryanodine receptors. I: A contraction study in *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **171**, 1-7.
- Roos M. H., Otsen M., Hoekstra R., Veenstra J. G. & Lenstra J. A.** (2004). Genetic analysis of inbreeding of two strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, **34**, 109-115.
- Rufener L., Kaminsky R. & Maser P.** (2009a). *In vitro* selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of α -tubulin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **168**, 120-122.
- Rufener L., Maser P., Roditi I. & Kaminsky R.** (2009b). *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. *PLoS Pathogens*, **5**, e1000380.
- Rufener L., Baur R., Kaminsky R., Maser P. & Sigel E.** (2010a). Monepantel Allosterically Activates DEG-3/DES-2 Channels of the Gastrointestinal Nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular Pharmacology*, **78**, 895-902.
- Rufener L., Keiser J., Kaminsky R., Maser P. & Nilsson D.** (2010b). Phylogenomics of ligand-gated ion channels predicts monepantel effect. *PLoS Pathogens*, **6**, e1001091.
- Sajid M. S., Iqbal Z., Muhammad G. & Iqbal M. U.** (2006). Immunomodulatory effect of various anti-parasitics: a review. *Parasitology*, **132**, 301-313.
- Sangster N. C., Whitlock H. V., Russ I. G., Gunawan M., Griffin D. L. & Kelly J. D.** (1979). *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. *Research in Veterinary Science*, **27**, 106-110.
- Sangster N. C., Riley F. L. & Collins G. H.** (1988). Investigation of the mechanism of levamisole resistance trichostrongylid nematodes of sheep. *International Journal for Parasitology*, **18**, 813-818.
- Sangster N. C., Davis C. W. & Collins G. H.** (1991). Effects of cholinergic drugs on longitudinal contraction in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, **21**, 689-695.
- Sangster N. C., Riley F. L. & Wiley L. J.** (1998). Binding of [³H]m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, **28**, 707-717.

- Saragoza P. A., Modir J. G., Goel N., French K. L., Li L., Nowak M. W. & Stitzel J. A.** (2003). Identification of an alternatively processed nicotinic receptor $\alpha 7$ subunit RNA in mouse brain. *Brain Research. Molecular Brain Research*, **117**, 15-26.
- Sargison N. D., Jackson F., Wilson D. J., Bartley D. J., Penny C. D. & Gilleard J. S.** (2010). Characterisation of milbemyacin-, avermectin-, imidazothiazole- and benzimidazole-resistant *Teladorsagia circumcincta* from a sheep flock. *Veterinary Record*, **166**, 681-686.
- Sasser J. N. & Freckman D. W.** (1987). A world perspective on nematology: the role of the Society. In *Vistas on Nematology: A Commemoration of the Twenty-fifth Anniversary of the Society of Nematologists* pp. 7-14. Society of Nematologists, Inc., Hyattsville, Maryland USA.
- Sato M., Yoonuan T., Sanguankiat S., Nuamtanong S., Pongvongsa T., Phimmayoi I., Phanhanan V., Boupha B., Moji K. & Waikagul J.** (2011). Short report: Human *Trichostrongylus colubriformis* infection in a rural village in Laos. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **84**, 52-54.
- Sattelle D. B., Jones A. K., Sattelle B. M., Matsuda K., Reenan R. & Biggin P. C.** (2005). Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *BioEssays*, **27**, 366-376.
- Schaeffer J. M. & Haines H. W.** (1989). Avermectin binding in *Caenorhabditis elegans*: A two-state model for the avermectin binding site. *Biochemical Pharmacology*, **38**, 2329-2338.
- Schallig H. D. & Van Leeuwen M. A.** (1997). Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology*, **114** (Pt 3), 293-299.
- Schallig H. D., van Leeuwen M. A. & Cornelissen A. W.** (1997a). Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunology*, **19**, 447-453.
- Schallig H. D., van Leeuwen M. A., Verstrepen B. E. & Cornelissen A. W.** (1997b). Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **88**, 203-213.
- Schofield P. R., Darlison M. G., Fujita N., Burt D. R., Stephenson F. A., Rodriguez H., Rhee L. M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T. A., Seeburg P. H. & Barnard E. A.** (1987). Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*, **328**, 221-227.
- Scott I., Khalaf S., Simcock D. C., Knight C. G., Reynolds G. W., Pomroy W. E. & Simpson H. V.** (2000). A sequential study of the pathology associated with the infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*, **89**, 79-94.
- Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dani J. A. & Patrick J. W.** (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *The Journal of Neuroscience*, **13**, 596-604.
- Severance E. G., Zhang H., Cruz Y., Pakhlevaniants S., Hadley S. H., Amin J., Wecker L., Reed C. & Cuevas J.** (2004). The $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Exists in Two Isoforms that Contribute to Functional Ligand-Gated Ion Channels. *Molecular Pharmacology*, **66**, 420-429.
- Shan Q., Haddrill J. L. & Lynch J. W.** (2001). Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 12556-12564.

- Shao Y. M., Dong K. & Zhang C. X.** (2007). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, **8**, 324.
- Shoop W. L., Mrozik H. & Fisher M. H.** (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, **59**, 139-156.
- Silvestre A. & Cabaret J.** (2002). Mutation in position 167 of isotype 1 α -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Molecular and Biochemical Parasitology*, **120**, 297-300.
- Silvestre A. & Humbert J. F.** (2002). Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *International Journal for Parasitology*, **32**, 921-928.
- Simpkin K. G. & Coles G. C.** (1981). The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **31**, 66-69.
- Sine S. M. & Engel A. G.** (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*, **440**, 448-455.
- Smeal M. G., Gough P. A., Jackson A. R. & Hotson I. K.** (1968). The occurrence of strains of *Haemonchus contortus* resistant to thiabendazole. *Australian Veterinary Journal*, **44**, 108-109.
- Smith T. S., Munn E. A., Graham M., Tavernor A. S. & Greenwood C. A.** (1993). Purification and evaluation of the integral membrane protein H11 as a protective antigen against *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, **23**, 271-280.
- Smith W. D.** (1999). Prospects for vaccines of helminth parasites of grazing ruminants. *International Journal for Parasitology*, **29**, 17-24.
- Squire M. D., Tornoe C., Baylis H. A., Fleming J. T., Barnard E. A. & Sattelle D. B.** (1995). Molecular cloning and functional co-expression of a *Caenorhabditis elegans* nicotinic acetylcholine receptor subunit (*acr-2*). *Receptors Channels*, **3**, 107-115.
- Stear M. J., Strain S. & Bishop S. C.** (1999). Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *International Journal for Parasitology*, **29**, 51-56.
- Steel H., de la Pena E., Fonderie P., Willekens K., Borgonie G. & Bert W.** (2010). Nematode succession during composting and the potential of the nematode community as an indicator of compost maturity. *Pedobiologia*, **53**, 181-190.
- Sumikawa K., Houghton M., Smith J. C., Bell L., Richards B. M. & Barnard E. A.** (1982). The molecular cloning and characterisation of cDNA coding for the α subunit of the acetylcholine receptor. *Nucleic Acids Research*, **10**, 5809-5822.
- Sumikawa K. & Nishizaki T.** (1994). The amino acid residues 1-128 in the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor contain assembly signals. *Brain Research. Molecular Brain Research*, **25**, 257-264.
- Touroutine D., Fox R. M., Von Stetina S. E., Burdina A., Miller D. M., 3rd & Richmond J. E.** (2005). *acr-16* encodes an essential subunit of the levamisole-resistant nicotinic receptor at the *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 27013-27021.
- Towers P. R., Edwards B., Richmond J. E. & Sattelle D. B.** (2005). The *Caenorhabditis elegans lev-8* gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor α subunit. *Journal of Neurochemistry*, **93**, 1-9.

- Towers P. R., Pym L., Yokota M., Matsuda K. & Sattelle D. B.** (2006). 7 mutants mimicking atypical motifs (YxxCC of loop-C, and E to H at -1' in TM2) in the *C. elegans* LEV-8 subunit affect nicotinic acetylcholine receptor function. *Invertebrate Neuroscience*, **6**, 69-73.
- Townsend L. B. & Wise D. S.** (1990). The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles. *Parasitology Today*, **6**, 107-112.
- Trailovic S. M., Clark C. L., Robertson A. P. & Martin R. J.** (2005). Brief application of AF2 produces long lasting potentiation of nAChR responses in *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **139**, 51-64.
- Treinin M., Gillo B., Liebman L. & Chalfie M.** (1998). Two functionally dependent acetylcholine subunits are encoded in a single *Caenorhabditis elegans* operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15492-15495.
- Turton J. A.** (1969). Anthelmintic action of levamisole injection in cattle. *Veterinary Record*, **85**, 264-265.
- Unwin N.** (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **346**, 967-989.
- Van den Bossche H. & De Nollin S.** (1973). Effects of mebendazole on the absorption of low molecular weight nutrients by *Ascaris suum*. *International Journal for Parasitology*, **3**, 401-407.
- Van den Bossche H., Rochette F. & Horig C.** (1982). Mebendazole and related anthelmintics. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*, **19**, 67-128.
- Van Wyk J. A., Stenson M. O., Van der Merwe J. S., Vorster R. J. & Viljoen P. G.** (1999). Anthelmintic resistance in South Africa: Surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **66**, 273-284.
- Vervelde L., van Leeuwen M. A. W., Kruidenier M., Kooyman F. N. J., Huntley J. F., van Die I. & Cornelissen A.** (2002). Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology*, **24**, 189-201.
- Vlassoff A. & McKenna P. B.** (1994). Nematode parasites of economic importance in sheep in New-Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, **21**, 1-8.
- Von Samson-Himmelstjerna G., Blackhall W. J., McCarthy J. S. & Skuce P. J.** (2007). Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology*, **134**, 1077-1086.
- Walker J., Hoekstra R., Roos M. H., Wiley L. J., Weiss A. S., Sangster N. C. & Tait A.** (2001). Cloning and structural analysis of partial acetylcholine receptor subunit genes from the parasitic nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*, **97**, 329-335.
- Wall E. C., Bhatnagar N., Watson J. & Doherty T.** (2011). An unusual case of hypereosinophilia and abdominal pain: an outbreak of *Trichostrongylus* imported from New Zealand. *Journal of Travel Medicine*, **18**, 59-60.
- Waller P. J., Echevarria F., Eddi C., Maciel S., Nari A. & Hansen J. W.** (1996). The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. *Veterinary Parasitology*, **62**, 181-187.

- Waller P. J., Rudby-Martin L., Ljungstrom B. L. & Rydzik A.** (2004a). The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Veterinary Parasitology*, **122**, 207-220.
- Waller P. J., Schwan O., Ljungstrom B. L., Rydzik A. & Yeates G. W.** (2004b). Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. *Veterinary Parasitology*, **126**, 299-315.
- Wee C. W., Lee S. F., Robin C. & Heckel D. G.** (2008). Identification of candidate genes for fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* using cDNA-AFLP. *Insect Molecular Biology*, **17**, 351-360.
- Wiley L. J., Weiss A. S., Sangster N. C. & Li Q.** (1996). Cloning and sequence analysis of the candidate nicotinic acetylcholine receptor subunit gene *tar-1* from *Trichostrongylus colubriformis*. *Gene*, **182**, 97-100.
- Wiley L. J., Ferrara D. R., Sangster N. C. & Weiss A. S.** (1997). The nicotinic acetylcholine -subunit gene *tar-1* is located on the X chromosome but its coding sequence is not involved in levamisole resistance in an isolate of *Trichostrongylus colubriformis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **90**, 415-422.
- Williamson S., Walsh T. & Wolstenholme A.** (2007). The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Brugia malayi* and *Trichinella spiralis* : a comparison with *Caenorhabditis elegans*. *Invertebrate Neuroscience*, **7**, 219-226.
- Williamson S. M., Robertson A. P., Brown L., Williams T., Woods D. J., Martin R. J., Sattelle D. B. & Wolstenholme A. J.** (2009). The nicotinic acetylcholine receptors of the parasitic nematode *Ascaris suum*: formation of two distinct drug targets by varying the relative expression levels of two subunits. *PLoS Pathogens*, **5**, e1000517.
- Winnier A. R., Meir J. Y. J., Ross J. M., Tavernarakis N., Driscoll M., Ishihara T., Katsura I. & Miller D. M.** (1999). UNC-4/UNC-37-dependent repression of motor neuron-specific genes controls synaptic choice in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*, **13**, 2774-2786.
- Witty M. J.** (1999). Current strategies in the search for novel antiparasitic agents. *International Journal for Parasitology*, **29**, 95-103; discussion 113-104.
- Wolstenholme A. J. & Rogers A. T.** (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, **131 Suppl**, S85-95.
- Xu M., Molento M., Blackhall W., Ribeiro P., Beech R. & Prichard R.** (1998). Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **91**, 327-335.
- Yassin L., Gillo B., Kahan T., Halevi S., Eshel M. & Treinin M.** (2001). Characterization of the deg-3/des-2 receptor: a nicotinic acetylcholine receptor that mutates to cause neuronal degeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **17**, 589-599.
- Zahler A. M.** (2005). Alternative splicing in *C. elegans*. *WormBook*, 1-13.
- Zheng Y., Hirschberg B., Yuan J., Wang A. P., Hunt D. C., Ludmerer S. W., Schmatz D. M. & Cully D. F.** (2002). Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 2000-2005.

ANNEXES

Annexe 1 Résumé de la communication orale présentée à la WAAVP 2009 (Calgary)**LEVAMISOLE resistance in gastrointestinal nematodes investigated at the molecular level.**

FAUVIN, A., CHARVET, C., CORTET, J., BOULIN, T., CABARET, J. and NEVEU, C
French National Institute for Agricultural Research (INRA) UR1282,
Infectiologie Animale et Santé Publique Centre de recherche de Tours,
NOUZILLY, 37380, France

Levamisole is a broad-spectrum anthelmintic drug widely used to control parasitic nematodes in livestock. However, the high efficacy of levamisole against the gastrointestinal nematodes in sheep and goats has been compromised by the development of resistance in field populations. Levamisole acts as an agonist of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) that is an important determinant of signal transmission at the neuromuscular junction. In the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, the levamisole-sensitive nAChR is composed of five multi-transmembrane spanning subunits encoded by *unc-29*, *lev-1*, *unc-63*, *unc-38* and *lev-8* genes and mutants lacking one of those genes are resistant to levamisole. Based on *C. elegans* molecular data, we have identified and sequenced *unc-29*, *lev-1*, *unc-63* and *unc-38* orthologs isolated from the trichostrongylid nematodes *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* that are causing major economic losses to sheep industry throughout the world. Phylogenetic relationship analyses of the nAChR subunit family indicated high evolutionary conservation among nematode species. To investigate molecular mechanisms involved in levamisole resistance, gene sequences and mRNA transcription levels were compared between levamisole resistant and susceptible *H. contortus*. Interestingly, expression of alternatively spliced mRNAs was specifically detected in resistant isolates and their functional relevance in levamisole resistance is in progress.

Annexe 2 Communication affichée présentée à EMOP X 2008 (Paris)

Identification of genes involved in levamisole resistance in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA-AFLP approach.

Fauvin A., Charvet C., Cortet J., Cabaret J., Neveu C.

INRA de Tours, unité IASP 213, équipe Résistance et Virulence des Parasites, université François Rabelais de Tours.



Introduction : *Haemonchus contortus* and other gastro-intestinal nematodes have a major impact on health of small ruminants world-wide. Today, the control of infection in livestock remains largely based on anthelmintic treatment. Among the different classes of anthelmintics, levamisole is widely used to eradicate parasitic nematodes in breeding of sheep or goats. However, levamisole treatments have been compromised by the development of resistance in field populations. In the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*, many genes can be involved in levamisole resistance. Among those genes some encode nicotinic acetylcholine receptor subunits, which constitute the levamisole pharmacological target. To investigate the mechanism(s) involved in levamisole resistance in the parasitic nematode *H. contortus*, a differential analysis of cDNA from resistant and susceptible isolates was performed using a cDNA-AFLP approach (Fig 1).

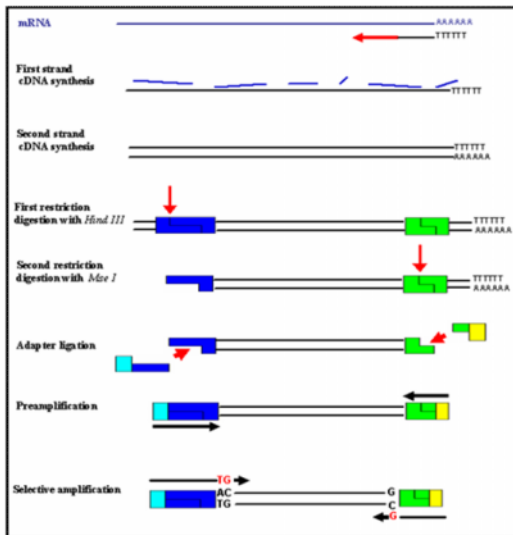


Figure 1 : Schematic representation of cDNA-AFLP technique

	1	10	20	30	40	50	60	70
HCRCR-0	ARAF	GIVL	VTIV	VYVESH	NRHRE	QLYED	LLYY	NRVPP
HA7	ARAF	GIVL	VTIV	VYVESH	NRHRE	QLYED	LLYY	NRVPP
	71	80	90	100	110	120	130	140
HCRCR-0	TA	LA	LE	HA	FD	YLA	HE	PT
HA7	SR	FL	KRP	TP	QV	HK	OR	
	141	150	160	170	180	190	200	210
HCRCR-0	SI	YK	FC	PI	NI	EY	FP	YS
HA7	SI	YK	FC	PI	NI	EY	FP	YS
	211	220	230	240	250	260	270	280
HCRCR-0	YQ	LE	HL	NS	LS	QR	HE	QL
HA7	YQ	LE	HL	NS	LS	QR	HE	QL
	281	290	300	310	320	330	340	350
HCRCR-0	HA	NT	FS	IS	IL	VSL	TV	FL
HA7	HA	NT	FS	IS	IL	VSL	TV	FL
	351	360	370	380	390	400	410	420
HCRCR-0	HA	NR	HF	IE	TL	PK	YI	GK
HA7	HA	NR	HF	IE	TL	PK	YI	GK
	421	430	440	450	460	470	480	490
HCRCR-0	RL	SQ	AL	KG	HP	DL	IR	HD
HA7	RL	SQ	AL	KG	HP	DL	IR	HD
	491	500	510	520	530	537		
HCRCR-0	Q	N	S	P	L	F	H	T
HA7	Q	N	S	P	L	F	H	T

Figure 4 : Alignment of the protein sequences of HA7 and HC-ACR-8

Conclusion : In the present study, a cDNA-AFLP strategy was developed in order to identify gene potentially involved in levamisole resistance in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. The differential analysis of transcriptome from LEV-resistant and LEV-susceptible isolates has led to the identification of a transcript derived fragment named HA7 presenting similarities with the *hc-acr-B* gene, an orthologue of *acr-B* gene from *C. elegans*. The specific expression of HA7 was confirmed in the two resistant isolates tested during the cDNA-AFLP experiment and a third resistant isolate. HA7 corresponded to a truncated form of *hc-acr-B* gene. The first 152 bp of *ha7* corresponded to the first and the second exon of *hc-acr-B*, while the second part of the transcript did not presented significant similarities in nucleotide databanks. The origin of the end of *ha7* remain actually unknown. The specific expression of HA7 in resistant isolates could suggest its implication in a resistance mechanism. Further characterization of HA7 includes promoter studies and functional validation using RNA interference technique.

Objectives : In order to identify genes differentially expressed in the LEV-resistant or LEV-susceptible nematodes, a comparative analysis of the transcriptome of two susceptible and two resistant isolates of *H. contortus* was performed. Approximately 17 280 TDFs (transcript derived fragments) were amplified and 26 presented a polymorphic pattern between resistant and susceptible isolates. Among those candidates we focused our attention on one TDF (named HA7) that was specifically expressed in resistant isolates (Fig 2) and presented significant similarities with the *hc-acr-B* gene of *H. contortus* (accession number : EU006785), an orthologue of the *C. elegans* *acr-B* gene that encodes a nicotinic acetylcholine receptor subunit. The goal of this study was the characterization of the cDNA corresponding to the TDF HA7.

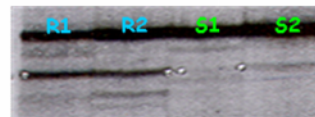


Figure 2 : cDNA-AFLP autoradiography : the TDF HA7 presented a differential pattern between resistant and susceptible *H. contortus* isolates.

Results : The expression pattern of HA7 was investigated on three LEV-resistant and three LEV-susceptible isolates using RT-PCR experiments. HA7 expression was specifically observed in resistant isolates (Fig 3). The full length sequence corresponding to HA7 was obtain by RACE-PCR using an oligodT primer for the identification of the 3' end and the splice leader sequence SL1 for the 5' end. A complete cDNA of 625 bp was obtained. Protein databanks searches revealed strong similarities with the orthologue of the *acr-B* gene of *Caenorhabditis elegans* in the first part of *ha7* cDNA sequence. The second part of the cDNA sequence presented a premature stop codon, and no significant similarities with proteins or ESTs in databanks. Alignment of the deduced amino acid sequence from *ha7* and *hc-acr-B* sequence is presented figure 4.

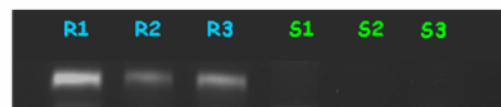


Figure 3 : Expression analysis of the TDF HA7 using RT-PCR experiments. Amplification products are specially observed in resistant isolates.

Annexe 3 : Article publié dans le bulletin de l'académie vétérinaire de France

COMMUNICATION

**STRONGLES DU TRACTUS DIGESTIF DES RUMINANTS :
MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX ANTHELMINTHIQUES ET
CONSÉQUENCES SUR LEUR GESTION**

*GASTROINTESTINAL STRONGYLES OF RUMINANTS:
MECHANISMS OF ANTHELMINTIC RESISTANCE AND CONSEQUENCES
ON THEIR MANAGEMENT*

Par Jacques CABARET, Claude CHARVET, Aymeric FAUVIN,
Anne SILVESTRE, Christine SAUVE, Jacques CORTET et Cédric NEVEU⁽¹⁾
(Communication présentée le 18 décembre 2008)

RÉSUMÉ

La gestion des infestations du tube digestif par les strongles chez les ruminants est essentiellement assurée par les traitements anthelminthiques. Seules trois familles chimiques sont disponibles et des phénomènes de résistance à ces produits sont apparus chez les strongles gastro-intestinaux. Les mécanismes de résistance concernant la famille des benzimidazoles sont relativement bien établis (un gène avec deux allèles est impliqué), alors que pour la famille des lactones macrocycliques ou celle des imidazothiazoles (lévamisole), les déterminismes génétiques, encore peu connus, sont sans doute multigéniques. Une double approche (« gènes candidats » et transcriptomique) est proposée pour le lévamisole et les premiers résultats sont présentés. La compréhension des mécanismes d'action est très importante pour tenter de réduire l'apparition de résistance. Des exemples concernant les benzimidazoles sont utilisés pour décrire l'interaction entre le type de mécanisme de résistance et la vitesse d'apparition et de diffusion de la résistance, l'efficacité des pressions sélectives par les traitements et le rôle des refuges.

Mots clés : strongles digestifs, anthelminthiques, lévamisole, résistance, ruminant, déterminisme génétique.

SUMMARY

The management of gastrointestinal strongyle infestations in ruminants relies mostly on anthelmintics. Only three chemical families are available, and gastrointestinal strongyles resistance is increasing. The resistance mechanisms are relatively well known for benzimidazoles (involving one gene with two alleles), whereas the genetic determinism of the resistance to macrocyclic lactones or imidazothiazoles (levamisole) is still poorly understood, but probably involves multigenic regulation. A double approach (candidate genes and transcriptomic) is proposed for levamisole resistance and the first results are presented. It is very important to understand resistance mechanisms to reduce their occurrences. Examples with benzimidazoles are presented to describe interactions between the type of genetic mechanism and the speed with which resistance appears and expands, the efficacy of selective pressure by treatments, and the role of refugia.

Keywords: gastrointestinal strongyles, anthelmintics, levamisole, resistance, ruminant

(1) INRA, IASP 213, 37800 Nouzilly, France.

INTRODUCTION

Les infestations du tube digestif par les strongles constituent un des problèmes parasitaires majeurs de l'élevage des ruminants à l'herbe. Les éleveurs ne disposent pas d'éléments indiscutables pour décider de l'opportunité des traitements, le laboratoire étant le seul à fournir des éléments objectifs. En effet, leur propre opinion, fondée sur ce qu'ils perçoivent des performances, ne constitue pas un guide vraiment efficace (Bouilhol *et al.* 2008). Le diagnostic est crucial pour une bonne gestion du traitement de ce parasitisme car l'utilisation actuelle des anthelminthiques est souvent irraisonnée. À l'échelle mondiale, les résistances aux différents anthelminthiques sont fréquentes chez les chèvres, les ovins et les bovins (Cabaret 2000) : la majorité des cas sont concentrés en Afrique du Sud, en Australie, en Nouvelle Zélande et plus récemment, en Amérique latine (Brésil et Argentine). En Europe, la résistance aux benzimidazoles est très largement distribuée chez les petits ruminants (Chartier *et al.* 2001 ; Silvestre *et al.* 2002) ; elle reste encore peu observée chez les bovins (Coles 2002 ; Demeler *et al.* 2008), son diagnostic étant encore exceptionnellement réalisé. La résistance au lévamisole a été très récemment mise en évidence en France dans un élevage caprin (Paraud *et al.*, 2009), ce qui implique une certaine vigilance, même pour les molécules qui présentent le moins de résistance pour les strongles. Nous sommes donc face à deux exigences :

- i) le contrôle du parasitisme par les strongles passe presque exclusivement par l'utilisation d'anthelminthiques,
- ii) les phénomènes de résistance en augmentation nous imposent d'utiliser avec la plus grande rigueur ces molécules anthelminthiques, afin de pérenniser leur usage, car la commercialisation de nouvelles molécules se fait attendre depuis les années 80.

Cette rigueur passe par le diagnostic de la résistance, afin de pouvoir suivre son évolution. Il est réalisé par des méthodes phénotypiques (évaluation de l'excrétion des œufs de strongles après un traitement) ou de biologie moléculaire (il faut alors un marqueur, ou mieux connaître un gène impliqué dans cette résistance). Le diagnostic de résistance par les méthodes de biologie moléculaire est pratiqué uniquement pour les benzimidazoles (Lumbert *et al.* 2001). Le travail de modélisation sur la résistance des strongles de Barnes *et al.* (1995) permet d'apprécier l'importance de la connaissance des mécanismes dans la compréhension de l'évolution de la résistance, ainsi que les moyens mis en œuvre pour contrecarrer sa diffusion. Le présent article a pour objectifs :

- i) de montrer l'importance des mécanismes de résistance dans la conception de la lutte contre ces parasites,
- ii) de présenter les mécanismes actuellement connus ou étudiés au sein de l'INRA, en se focalisant plus particulièrement sur une molécule encore ressource en Europe, le lévamisole.

LES FAMILLES D'ANTHELMINTHIQUES

Les anthelminthiques disponibles, peu nombreux, sont classés en trois familles selon leur mode d'action, les benzimidazoles et pro-benzimidazoles, les avermectines, et le lévamisole (et le tétramisole encore utilisé dans les pays en voie de développement), ainsi que les dérivés des tetrahydropyrimidines (pyrantel et morantel) qui se rapprochent par le mode d'action, du lévamisole. Les mécanismes de résistance sont présentés dans le **tableau 1** ; ils sont cependant loin d'être élucidés, même pour les benzimidazoles pourtant les plus étudiés. Ce classement en familles n'a de sens que dans la mesure où la résistance montrée par un nématode contre une famille d'anthelminthiques ne préjuge pas de la résistance aux autres familles. Dans des zones où la résistance à plusieurs molécules est commune, en Australie par exemple, des associations triples ou quadruples sont proposées pour lutter contre les peuplements de strongles résistants (Triton® : ivermectine, lévamisole, albendazole ou Q-drench® Multi-combination Drench for Sheep : abamectine, albendazole, closantel, lévamisole).

Familles d'anthelminthiques	Mécanisme de résistance	Commentaires
Benzimidazoles	Isotype 1 de la β -tubuline : mutation point en position 200.	Résistance la plus étudiée au plan phénotypique et moléculaire. Mutation point en position 200, rencontrée chez les principaux strongles de ruminants résistants aux benzimidazoles. D'autres mutations points possiblement impliquées (Mottier & Prichard, 2008).
	Isotype 2 de la β -tubuline : mutation point ou délétion.	Importance mineure chez les strongles et controversée chez les douves résistantes au triclabendazole. (Ryan <i>et al.</i> , 2008).
Lactones macrocycliques : Avermectines et milbemycines	Mutations des canaux chlorure des récepteurs du glutamate ou de l'acide gamma aminobutyrique (GABA).	Mise en évidence chez <i>Cooperia oncophora</i> (Njue <i>et al.</i> 2004) par les méthodes de biologie moléculaire.
	Surexpression des P-glycoprotéines.	Rôle dans d'autres résistances (Kerboeuf <i>et al.</i> 2003).
Imidazothiazole : Lévamisole	Changements dans les récepteurs nicotinniques de l'acétylcholine.	Encore très peu d'information sur les mécanismes moléculaires chez les strongles ; résistance commune avec les dérivés de la tetrahydropyrimidine (Pyrantel, Morantel).

Tableau 1 : Mécanismes possibles de résistance des strongles aux trois grandes familles d'anthelminthiques du marché. (Modifié de Woisstenholme *et al.* 2004).

STRATÉGIES D'ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE DES STRONGLES AU LEVAMISOLE

Parmi les trois familles d'anthelminthiques les plus couramment utilisées, les imidazothiazoles (lévamisole) sont restés efficaces malgré une utilisation pendant plusieurs décennies. En effet, l'acquisition de la résistance au lévamisole est moins fréquente et moins rapide que celle aux benzimidazoles et aux avermectines. Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la résistance au lévamisole est déterminante pour prolonger l'efficacité des traitements.

Le lévamisole est un agoniste cholinergique spécifique des nématodes et les récepteurs nicotinniques de l'acétylcholine sensibles au lévamisole (L-AChR) constituent la cible majeure des traitements anthelminthiques. Leur rôle déterminant dans l'acquisition de la résistance a été démontré en comparant les courbes de déplacement de l'équilibre agoniste-récepteur, dans des isolats de strongles *Haemonchus contortus*, résistants et sensibles au lévamisole (Sangster *et al.* 1998), puis dans ceux de larves L3 d'un nématode parasite *Oesophagostomum dentatum* (Martin *et al.* 2003). Les résultats suggèrent que la résistance est associée à une diminution de l'affinité et/ou du nombre des récepteurs du lévamisole.

Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la résistance au lévamisole, deux approches complémentaires sont actuellement développées à l'INRA. La première est basée sur une stratégie des « gènes candidats » et la seconde, sur une analyse différentielle des transcriptomes de strongles, issus d'isolats sensibles et résistants au lévamisole.

Stratégie des « gènes candidats »

Les bases génétiques de la résistance au lévamisole sont étudiées chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*. Chez cette espèce, très proche phylogénétiquement des strongles, la sélection de mutants résistants au lévamisole a permis d'identifier 14 gènes pouvant être impliqués dans le phénotype (Fleming *et al.* 1997; Culetto *et al.* 2004; Towers, 2005). Parmi ces gènes, *unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* et *lev-8* codent des sous-unités protéiques qui participent à la constitution du récepteur nicotinnique de l'acétylcholine sensible au lévamisole (L-AChR). Récemment, chez le même modèle, ont été identifiés cinq gènes indispensables à la synthèse des L-AChRs : trois gènes codant des sous-unités α , deux, des sous-unités non- α et trois, des protéines auxiliaires impliquées dans l'assemblage et le trafic des récepteurs (Boulin *et al.* 2008). Il apparaît donc que les gènes codant les sous-unités du L-AChR, mais aussi ceux impliqués dans la régulation de sa synthèse, sont des candidats particulièrement intéressants.

Notre objectif prioritaire a été le clonage des gènes orthologues de *unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* et *lev-8* chez les trois principales espèces de strongles d'intérêt agronomique ayant développées des résistances au lévamisole : *Haemonchus*

contortus, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Les orthologues de tous ces gènes ont été identifiés et clonés chez les trois espèces à l'exception de l'orthologue du gène *lev-8* qui ne semble pas être présent chez les strongles étudiés.

Dans des isolats d'*H. contortus* sensibles et résistants au lévamisole, la comparaison des séquences des ADNc complets correspondant aux différentes sous-unités du L-AChR n'a pas permis de mettre en évidence de polymorphisme associé à la résistance. En revanche, l'analyse de l'expression des sous-unités du récepteur a révélé l'existence de transcrits tronqués, spécifiquement exprimés dans les isolats résistants pour les sous-unités orthologues de *unc-38* et *unc-29*. Ces transcrits pourraient résulter d'événements d'épissage alternatif conduisant à la production de sous-unités tronquées du récepteur du lévamisole. À l'heure actuelle, l'implication de ces protéines tronquées dans la résistance au lévamisole reste à déterminer, cependant les récents progrès réalisés dans le domaine de l'expression des sous-unités du récepteur du lévamisole dans des systèmes hétérologues, tels que l'œuf de Xénope, offrent des perspectives particulièrement prometteuses (Boulin *et al.* 2008).

Approche transcriptomique

En complément de l'approche par l'étude des gènes candidats, une analyse différentielle des transcriptomes de nématodes issus de populations d'*H. contortus* résistantes et sensibles au lévamisole a été réalisée. Son but est d'identifier d'une part des marqueurs de résistance et d'autre part, un ou plusieurs gènes impliqués dans un éventuel mécanisme d'acquisition de la résistance spécifique aux strongles digestifs.

Pour cette étude, quatre populations (deux résistantes et deux sensibles) isolées indépendamment dans des élevages d'origine géographique distincte ont été utilisées. Pour chacune d'elles, environ 8640 fragments de transcrits ou TDF (Transcript Derived Fragment) ont été amplifiés par la technique cDNA-AFLP (Bachem *et al.* 1996). Parmi ces TDF, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ceux présentant un polymorphisme commun aux populations résistantes ou sensibles. Au total, 34 candidats ont été identifiés et l'un d'entre eux, nommé HIA17, a été caractérisé plus en détail. Ce gène, spécifiquement exprimé chez les isolats résistants, correspond au premier marqueur de résistance au lévamisole identifié à ce jour chez un nématode (Neveu *et al.* 2007). La caractérisation des autres candidats nous a permis de mettre en évidence l'expression spécifique, chez les populations résistantes testées, d'une forme tronquée d'un transcrit correspondant à l'orthologue d'un gène de *C. elegans* codant une sous-unité du récepteur nicotinnique de l'acétylcholine. Ce candidat pourrait donc participer à la formation du récepteur du lévamisole chez les strongles et les formes tronquées observées pourraient être impliquées dans le phénotype de résistance.

DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE ET CONSÉQUENCES SUR L'ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE

Le déterminisme génétique joue un rôle essentiel dans les modalités de l'évolution de la résistance. Il est le résultat ultime de l'étude de la résistance au niveau moléculaire. Il peut être aussi approché par des travaux de modélisation, fondés sur différentes hypothèses.

Déterminisme mono ou polygénique

La sélection de la résistance est plus rapide si le mécanisme dépend d'un seul gène plutôt que de plusieurs (dans l'hypothèse d'un effet additif des n allèles de résistance et d'un équilibre de liaison entre les gènes) (Barnes *et al.* 1995). La dominance ou la codominance des allèles de résistance ont aussi des effets marqués sur l'évolution de la résistance. Dans le modèle d'un gène avec deux allèles, la résistance évolue plus rapidement quand elle est dominante, plus lentement quand elle est codominante et encore plus lentement, quand elle est récessive. Ces hypothèses, sur le mécanisme génétique des résistances, sont très difficiles à vérifier sur des résultats expérimentaux, car d'autres phénomènes peuvent interférer avec ce mécanisme, comme par exemple la capacité adaptative des génotypes résistants et sensibles. Cela montre la grande nécessité des études moléculaires qui permettront de définir réellement le déterminisme des résistances.

Exemple chez les benzimidazoles

C'est la résistance la plus étudiée et la plus répandue.

Déterminisme monogénique et récessif

Le déterminisme génétique de la résistance aux benzimidazoles a été mis en évidence par Kwa *et al.* (1994) chez le strongle *Haemonchus contortus*. Une mutation point en position 200 induit la résistance. Seuls les individus possédant les deux allèles de résistance sont résistants aux benzimidazoles. Ce mécanisme récessif a été retrouvé chez la majorité des espèces de strongles (*Téladorsagia circumcincta*, Elard *et al.* 1999; *Trichostrongylus colubriformis*, Grant & Mascord 1996; *Trichostrongylus axei*, Palcy *et al.* 2008).

Résistance et pression de sélection par les anthelminthiques

Le nombre de traitements est un élément fondamental de la sélection (Silvestre *et al.* 2002; Gaba *et al.* 2006). En Auvergne, des traitements peu fréquents, utilisant les trois grandes familles ont toutefois abouti à une résistance aux benzimidazoles. De même, au Maroc dans la région de Rabat, des résistances aux benzimidazoles sont présentes malgré la faible fréquence des traitements par ces molécules. C'est donc l'efficacité sélective des traitements qui joue un rôle, plutôt que leur nombre. D'autres facteurs ont également un poids très important, la fréquence des introductions d'animaux étrangers au troupeau ou la présence de refuges.

Résistance et impact sur la « fitness » (maintien de la résistance ou réversion)

Globalement, la « fitness » (valeur reproductive) semble identique entre les individus sensibles et résistants, au moins pour *T. circumcincta*, tant dans les conditions expérimentales (Elard *et al.* 1998) que naturelles (Leignel 2000). Toutefois, certains traits de vie (fertilité des vers et vitesse d'évolution du stade larvaire au stade adulte) sont différents chez les souches sensibles ou résistantes chez *T. circumcincta* (Leignel & Cabaret, 2001) ou *Haemonchus contortus* (Melo 2005). Il semble que les aptitudes des vers sensibles à l'aune de la durée ne soient pas inférieures à celles des vers résistants même si certains sont affectées positivement ou négativement. Ainsi chez *H. contortus*, les vers résistants ont une meilleure faculté à s'installer chez l'hôte, une meilleure fertilité, mais par contre le développement des œufs émis est inférieur dans des conditions correspondant aux périodes chaudes (Melo 2005); toutefois, globalement, la « fitness » sur plusieurs générations n'est pas statistiquement différente entre les populations résistantes et sensibles. Les changements de famille d'anthelminthiques peuvent avoir des conséquences importantes sur la faune des strongles. Le cas de *T. axei* (Palcy *et al.* 2008) mérite d'être mentionné: dès l'arrêt des traitements par les benzimidazoles, au cours desquels ils ont acquis une résistance, la proportion des vers résistants n'a cessé de diminuer pendant les six années d'études. En fait, la fréquence de ce parasite est plus élevée lorsque celles des autres espèces diminue, ce qui serait sans doute le résultat d'interactions négatives (capacité à l'installation ou durée de survie des vers) avec les autres espèces de strongles (Cabaret & Hoste, 1998). Cette diminution peut être imputée au développement des autres espèces de strongles sensibles, qui ne sont plus défavorisées par les traitements par les benzimidazoles. Cette réversion apparente pour *T. axei* ne serait donc qu'une conséquence des interactions entre espèces.

Résistance et impact sur les refuges (maintien des allèles de sensibilité)

La notion de refuge a été prise par les nématologistes d'une façon très large, alors que primitivement, cette définition est restrictive pour les généticiens des populations, puisqu'elle porte sur des fragments de population (incluant tous les stades du cycle parasitaire). Pour les strongles, ce qui est central est le fait qu'une population ou certains stades de la population échappent à la pression de sélection par les anthelminthiques. Le rôle de ces refuges a été initialement remarqué par van Wyk (2001) et leur participation dans l'établissement de la résistance a été confortée par modélisation (Gaba *et al.* 2006) ou par des constatations d'experts (Kenyon *et al.* 2008). Ainsi, l'existence de parcelles utilisées contaminées par des animaux non traités, le fait que seulement certains animaux (ceux que l'on suppose à haut risque) soient traités (ce qui est le principe des traitements individuels sélectifs ou TSI, Cabaret 2008) sont des moyens de nourrir ces refuges. Le maintien de ces refuges, s'il est efficace pour contenir l'évolution de la résistance, est toutefois une contrainte pour gérer l'intensité de l'infestation. Un compro-

mis est donc à trouver entre le contrôle de l'infestation et la gestion de la résistance. Ce compromis est relativement facile à trouver, et les éleveurs qui utilisent ce système TST ne sont pas pénalisés au plan des productions (Van Wyk & Bath 2002, Benoit *et al.* 2009).

CONCLUSIONS

La résistance aux anthelminthiques est un phénomène généralisé et il concerne surtout actuellement les benzimidazoles. Elle

est très fréquente chez les petits ruminants et beaucoup moins chez les bovins. L'existence de cette résistance oblige à adapter une stratégie du contrôle des strongles. Il n'est plus question d'envisager le traitement des animaux pour éradiquer les strongles, mais au contraire d'accepter que des animaux ne soient pas traités, que des parcelles contaminées soient des sources pour le maintien des « bons allèles » de sensibilité aux anthelminthiques. Il est certain que des études concernant le mécanisme de transmission de la résistance sont essentielles et permettront une lutte plus adéquate contre les strongles.

REMERCIEMENTS

Les financements du Comité INRA pour l'Agrobiologie, du projet européen Parasol, du département de Santé animale pour la thèse de S. Gaba, de la Région Martinique pour celle de C. Paly et de la région Centre pour A. Fauvin ont été une aide décisive pour accomplir certains des travaux présentés dans cette revue.

BIBLIOGRAPHIE

- Bachevalier, C.W.B., Van der Hoeven, R.S., De Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R.G. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AHP. Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9 (5) : 745-753.
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Barger, I.A. 1995. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today* 11 (2) : 56-63.
- Benoit, M., Tournadre, H., Dulphy, J.P., Laignel G., Prache, S., Cabaret, J. 2009. Intensification of ewe reproduction rhythm sustainable in an organically managed sheep production system? A four-year interdisciplinary study. *Animal* (sous presse).
- Boulin, T., GJelen, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 105 (47) : 18590-18595.
- Cabaret, J. 2000. Anthelmintic resistance in goats: from fiction to facts. In *Proceeding of the 7th international conference on goats*, Tours-Poitiers, (France), pp. 793-794.
- Cabaret, J. 2008. Pro and cons of targeted selective treatment against digestive tract strongyles of ruminants. *Parasite* 15 (3) : 506-509.
- Chartier, C., Soublac, F., Pors, I., Silvestre, A., Hubert, J., Couquet, C., Cabaret, J. 2001. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *Journal of Helminthology* 75 (4) : 325-330.
- Coles, G.C. 2002. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? *Veterinary Research* 33 (5) : 481-490.
- Culetto, L., Baylis, H.A., Richmond, J.E., Jones, A.K., Fleming, J.T., Squire, M.D., Lewis, J.A. & Satelle, D.B. 2004. The *Caenorhabditis elegans* unc-63 gene encodes a levamisole sensitive nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *The Journal of Biochemical Chemistry* 279 (41) : 42476-42483.
- Demeler, J., Van Zeveren, A.M.J., Kleinschmidt, N., Verbruyse, J., Höglund, J., Koopman, R., Cabaret, J., Claerebout, E., Areskog, M., Von Samson Himmelstjerne, G. 2008. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro-intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Veterinary Parasitology*, 2008 Oct 19 (sous presse).
- Elard, L., Comes, A.M., Humbert, J.F. 1996. Sequence s of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Molecular and Biochemical Parasitology* 79 (2) : 249-253.
- Elard, L., Sauve, C., Humbert, J.F. 1998. Fitness of benzimidazole resistant and susceptible worms, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitology* 117 (6) : 571-578.
- Fleming, J.T., Squire, M.D., Barnes, T.M., Tornøe, C., Matsuda, K., Fire, A., Barnard, E.A., Sarelle, D.B., Lewis, J.A. 1997. *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29* and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Journal of Neuroscience* 17 (15) : 5843-5857.
- Gaba, S., Cabaret, J., Giot, V., Silvestre, A. 2006. The early drug selection of nematodes to anthelmintics : stochastic transmission and population in refuge. *Parasitology* 133 (3) : 345-350.
- Grant, W.N., Mascord, L.J. 1996. Beta-tubulin gene polymorphism and benzimidazole resistance in *trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 26 (1) : 71-77.
- Humbert, J.F., Cabaret, J., Elard, L., Laignel, V., Silvestre, A. 2001. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. *Veterinary Parasitology* 101 (3/4) : 405-414.
- Koryon, E., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., Van Wyk, J.A., Thomas, E., Verbruyse, J., Jackson, F. 2008. The role of targeted and targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology* (sous presse).
- Kerboeuf, D., Blackhall, W., Kaminsky, R., von Samson Himmelstjerne, G. 2003. P glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of antimicrobial agents* 22 (3) : 332-346.
- Kwa, M.S., Veenstra, J.G., Roos, M.H. 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved

COMMUNICATION

- mutation at amino acid 200 in beta tubulin Iso-type 1. *Molecular and Biochemical Parasitology* 63 (2) : 299-303.
- Leignel, V. 2000. *Diversité génétique et résistance aux benzimidazoles chez *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda, Trichostrongylidae), parasite de petits ruminants*. Thèse Université Montpellier II, France, 170 p.
 - Leignel, V., Cabaret, J. 2001. Massive use of chemotherapy influences life traits of parasitic nematodes in domestic ruminants. *Functional Ecology* 15 (5) : 569-574.
 - Martin R.J., Bai, G., Clark, C.L., Robertson, A.P. 2003. Methyridine and levamisole activate different Ach receptor subtypes in nematode parasite: a new lead for levamisole resistance. *British Journal of Pharmacology* 140 (6) : 1068-1076.
 - Melo, A.C. 2005. *Resistance to benzimidazoles in nematode *Haemonchus contortus* in Ceara State*. Thèse Université de Ceara, Fortaleza, Brésil, 170 p.
 - Mottier, M.D., Prichard, R.K. 2008. Generic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenetics and Genomics* 2 (2) : 129-140.
 - Neveu C., Charvet, C., Fauvin, A., Cortet, J., Cabaret, J. 2007. Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA-AFLP approach. *Parasitology* 134 (8) : 1105-1110.
 - Njuc, A.I., Hayashi, J., Kinne, L., Feng, X.P., Prichard R.K. 2004. Mutations in the extracellular domain of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *Journal of Neurochemistry* 89 (5) : 1137-1147.
 - Palcy, C., Silvestre, A., Sauve, C., Cortet, J., Cabaret, J. 2008. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *The Veterinary Journal*, 2008 Nov 1 (sous presse).
 - Paraud, C., Kulo, A., Poir, I., Chartier, C. 2009. Multiple anthelmintic resistance in goat nematodes on a farm in France. *Veterinary Record*. (sous presse).
 - Ryan, L., Hoey, E., Trudgett, A., Fairweather, I., Fuchs, M., Robinson, M.W., Chambers, E., Timson, D.J., Ryan, E., Feltwell, T., Ivens, A., Bentley G. & Johnston, I. 2008. *Haesclola hepatica* expresses multiple α - and β tubulin isotypes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 159 (1) : 73-78.
 - Sangster, N.C., Riley, F.I., Wiley, I.J. 1998. Binding of [3 H]m-aminolevamisole to receptors in levamisole susceptible and resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 28 (5) : 707-717.
 - Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J.F., Chartier, C., Cabaret, J. 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary Research* 33 (5) : 465-480.
 - Towers, P.R., Edwards, B., Richmond, J.E., Sarelle, D.B. 2005. The *Caenorhabditis elegans lev-8* gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor α subunit. *Journal of Neurochemistry* 93 (1) : 1-9.
 - Van Wyk, J.A., 2001. Refugia - overlooked as perhaps the most important factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 68 (1) : 55-67.
 - Van Wyk, J.A. & Bath G.F. 2002. The Famacha® system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research* 33 (5) : 509-529.
 - Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Iljimebjergna C., Sangster, N.C. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20 (10) : 469-473.

Résumé

Actuellement, la lutte contre les strongles digestifs est essentiellement basée sur l'utilisation de traitements anthelminthiques. Cependant, leur utilisation massive a conduit à l'apparition d'isolats résistants. L'optimisation des stratégies de lutte nécessite une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la résistance. Dans ce contexte, nous avons cherché à identifier le récepteur au lévamisole, une des molécules anthelminthiques les plus utilisées en élevage. Nous avons mis en évidence l'existence d'une forme tronquée d'une des sous-unités du récepteur au lévamisole chez certains isolats résistants des 3 principales espèces de strongles digestifs : *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Le rôle de cette forme tronquée dans la fonctionnalité du récepteur a été testé en reconstituant le récepteur au lévamisole d'*H. contortus* en œufs de xénope. Ainsi, nous avons montré que la forme tronquée perturbe le fonctionnement normal du récepteur. Ce résultat constitue la première validation fonctionnelle d'un mécanisme moléculaire de résistance au lévamisole chez un nématode parasite.

Mots clés : Nématode, lévamisole, résistance, anthelminthiques, récepteur à l'acétylcholine.

Abstract

The control of gastrointestinal strongyles is largely based on the use of anthelmintic treatments. However, the widespread use of these treatments has led to the emergence of resistant isolates. The optimization of control strategies requires a better understanding of the molecular mechanisms involved in the acquisition of resistance. In the present study, we have identified the receptor of levamisole, an anthelmintic molecule widely used in livestock. We demonstrated the existence of a truncated form of subunits in some resistant isolates in the 3 main species of gastrointestinal nematodes: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. The role of this truncated form in the receptor functionality was tested by reconstituting the receptor of levamisole of *H. contortus* in *Xenopus* oocytes. Thus, we showed that the truncated form disrupts the normal function of the receptor. Here we provide the first functional evidence for a molecular mechanism involved in levamisole resistance in a parasitic nematode.

Keywords : Nematode, levamisole, anthelmintic, resistance, acetylcholine receptor.