

ECOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV)

EQUIPE Multirésistances et pouvoir Pathogène des Nématodes

UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, INRAE Centre Val de Loire

THESE présentée par : **Nicolas LAMASSIAUDE**

Soutenue le : **16 décembre 2020**

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : **Science de la Vie et de la Santé**

Identification et caractérisation fonctionnelle des cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques des invertébrés

Thèse dirigée par :

Mr NEVEU Cédric

Directeur de recherche, INRAE Val de Loire (Tours)

Co-encadrée par :

Mr CHARVET Claude

Ingénieur d'étude, INRAE Val de Loire (Tours)

RAPPORTEURS :

Mme RAYMOND-DELPECH Valérie

Professeure, Université d'Angers

Mr THIBAUD Jean-Baptiste

Directeur de recherche, CNRS, Université de Montpellier

PRESIDENTE DE JURY :

Mme DIMIER-POISSON Isabelle

Professeure, Université de Tours

JURY :

Mr BEECH Robin

Professeur associé, Université de McGill (Canada)

Mr CHARNET Pierre

Directeur de recherche, CNRS, Université de Montpellier

Mme DIMIER-POISSON Isabelle

Professeure, Université de Tours (présidente de jury)

Mme DUITTOZ Anne

Professeure, Université de Tours

Mr NEVEU Cédric

Directeur de recherche, INRAE Val de Loire (Tours)

Mme RAYMOND-DELPECH Valérie

Professeure, Université d'Angers

Mr THIBAUD Jean-Baptiste

Directeur de recherche, CNRS, Université de Montpellier

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) dans l'unité Infectiologie et Santé Publique (ISP) du département de Santé Animal de Nouzilly (37). Ce projet a été cofinancé par l'INRAE et par la région Centre Val de Loire.

Dans un premier temps, je remercie grandement les membres de mon jury de soutenance de thèse, Valérie Raymond, Jean-Baptiste Thibaud, Robin Beech, Isabelle Dimier-Poisson, Anne Duittoz et Pierre Charnet qui m'ont fait l'honneur de m'accorder de leur temps pour évaluer mon travail de ces trois dernières années.

Je tiens à remercier Cédric Neveu et Claude Charvet pour leur encadrement durant ces 3 dernières années ainsi que pour m'avoir accordé leur confiance pour mener à bien ce projet de thèse.

Je remercie les membres des équipes MPN (Jacques Cortet, Fabrice Guegnard, Delphine Serreau, Christine Koch, Morgane Miclon, Michel Boisseau, Guillaume Sallé, Tina Hansen, Abdallah Harmache, Adrian Wolstenholme, Barbara Reaves, Georg Von-Samson Himmelstjerna) et BioMAP (Françoise Debierre-Grockiego, Berthine Toubate, Catherine Dupuy-Papin) ainsi que les personnes impliquées de près ou de loin dans ce projet et avec qui j'ai pu travailler, discuter de Sciences, récolter des conseils ou simplement partager un café. Je tiens à remercier particulièrement Elise Courtot pour son aide et son soutien quotidien autant d'un point de vue scientifique qu'humain. Je remercie également les étudiants que j'ai pu encadrer pendant cette thèse et qui m'ont également beaucoup appris en retour. Merci à Angélique Corset, Clément Auger, Corentin Mallet et Nancy Jabbour avec qui je me suis liés d'amitiés.

Merci à mes collègues encore étudiants et à ceux ayant fini leurs études depuis un moment, Ambre Baillou, Tiffany Pezier, Jason Loyau, Guillaume Sadrin, Aurélien Chuard, Michel Boisseau, Morgane Miclon, Marine Pons, Marianne Nicolas, Adeline Ribero E Silva pour tous ces afterworks et autres activités récréatives ainsi qu'à mes amis François Billac, Pierre Belfond, Thomas Henry, Julien DeAlmeida, Sylvain Derré et Marc Gollab pour ces grands moments.

Un immense merci à Thibaut Chazeirat et à Alice Desmarchais pour votre amitié et pour m'avoir apporté votre soutien quand j'en avais le plus besoin. Cœurs sur vous !

Enfin, je remercie chaleureusement mes parents ainsi que mon frère pour leur force, leur amour, leur temps (merci pour les nombreuses relectures) et leur soutien inconditionnel à mon égard et avec qui je souhaite partager toutes mes réussites.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAP : American Academy of Pediatrics	GluCl : canaux chlorure glutamate-dépendant
ABC : ATP Binding Cassette	Gly : Glycine
ADN : acide désoxyribonucléique	GRD : GABA and glycine-like receptor of <i>Drosophila</i>
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	Hco : <i>Haemonchus contortus</i>
Aga : <i>Anopheles gambiae</i>	HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Ala : Alanine	Hsa : <i>Homo sapiens</i>
Ame : <i>Apis mellifera</i>	Isc : <i>Ixodes scapularis</i>
ARN : acide ribonucléique	IVM : ivermectine
ARNc : acide ribonucléique complémentaire	KCl : chlorure de potassium
ARNm : ARN messenger	KH₂PO₄ : Phosphate de monopotassium
Asn : Asparagine	LB : Luria Bertani
BET : bromure d'éthidium	LCCH3 : ligand-gated chloride channel homologue 3
BLAST : Basic Local Alignment Tool	LF : Lymphatic Filariasis (filariose lymphatique)
Bma : <i>Brugia malayi</i>	LGIC : Ligand Gated Ion Channel
BSA : Bovine Serum Albumin	Lst : <i>Laodelphax striatellus</i>
CaCl₂ : chlorure de calcium	Mdo : <i>Musca domestica</i>
CDC : Centers for Disease Control and Prevention	MDR : Multidrug Resistance
CDS : Coding DNA Sequence	Met : Méthionine
CE₅₀ : Concentration Efficace à 50% (EC ₅₀)	MgSO₄ : sulfate de magnésium
Cel : <i>Caenorhabditis elegans</i>	ML : Macrocyclic Lactone (lactone macrocyclique)
CGC : Caenorhabditis Genetics Center	Na₂EDTA.2H₂O : acide éthylènediaminetétraacétique dihydraté
CI₅₀ : Concentration Inhibitrice à 50% (IC ₅₀)	Na₂HPO₄ : hydrogénophosphate de sodium
Cna : <i>Cylicocyclus nassatus</i>	nAChR : nicotinic acetylcholine receptor (récepteur nicotinique de l'acétylcholine)
Con : <i>Cooperia oncophora</i>	NaCl : chlorure de sodium
DEC : diéthylcarbamazine	NaOH : hydroxyde de sodium
DMSO : diméthylsulfoxyde	NCBI : National Center for Biotechnology Information
dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate	NGM : Nematode Growth Medium
Dme : <i>Drosophila melanogaster</i>	NIH : National Institutes of Health
DTT : dithiothréitol	NTP/CAP : nucleoside triphosphate/cap analogue
EDTA : Ethylène Diamine Tétra sodium Acétate	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
FECR : Fecal Egg Count Reduction	pARNi : petits ARN interférents ou siRNA
FECRT : Fecal Egg Count Reduction Test	pb : paire de bases
GABA : acide γ-aminobutyrique	PBS : Phosphate Buffered saline
GABACl : canal chlorure sensible au GABA	
GFP : Green Fluorescent Protein	
GLC : glutamate-gated chloride channel	

Peq : *Parascaris equorum*

Phh : *Pediculus humanus humanus*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PgP : P-glycoprotéines formant des pompes d'efflux

Pun: *Parascaris univalens*

Pxy: *Plutella xylostella*

RACE-PCR : Rapid amplification of cDNAs end –
Polymerase Chain Reaction

RDL : Resistance to Dieldrin

Rmi: *Rhipicephalus microplus*

RNAi: ARN interference

qRT-PCR : reverse transcription quantitative
polymerase chain reaction

SEM : Standard Error of the Mean

Ser: Sérine

SL1: Splice Leader 1

Ssu : sous-unités

TAE : Tris acétate EDTA

TAECl: tétraéthylammonium chloride

TAEOH: hydroxyde de tétraéthylammonium chloride

Tca : *Tribolium castaneum*

TEVC Two Electrode Voltage-Clamp (voltage clamp
en double électrodes)

Thr: Thréonine

TM : Domaine transmembranaire

Tur: *Tetranychus urticae*

UTR : Untranslated region

UV : ultraviolet

WHO: World Health Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle de vie Alien (adaptée de Magnets N More)	14
Figure 2 : Anatomie d'un <i>C. elegans</i> hermaphrodite (adaptée de WormAtlas)	16
Figure 3 : Arbre phylogénétique des Nématodes basé sur des analyses de la petite sous-unité des ARNr avec les clades indiqués (adaptée de Blaxter et al, 2015)	18
Figure 4 : Arbre phylogénétique des Nématodes basé sur des analyses de 181 gènes codant pour des protéines de 23 espèces de nématodes et 4 espèces d'Ecdysozoaires utilisées comme outgroup avec les clades indiqués (adaptée de Blaxter et al, 2015)	19
Figure 5: Cycle de développement de <i>C. elegans</i> (figure issue de WormAtlas)	21
Figure 6: Cycle de développement de <i>Brugia malayi</i> (issue du Centre pour le contrôle et la prévention des maladies, CDC) ..	24
Figure 7 : Photographie d'un ver <i>Parascaris sp.</i> adulte récupéré dans les fécès de poulains après traitement à l'ivermectine	26
Figure 8 : Cycle de développement de <i>Parascaris sp.</i> dont le stade adulte est retrouvé dans l'intestin grêle (adaptée de Merial)	27
Figure 9 : Schéma de la structure morphologique des insectes en se basant sur la morphologie du pou de corps humain <i>Pediculus humanus humanus</i> (adaptée du mémoire de Nancy Jabbour)	32
Figure 10: Photographie de poux adultes mâles et femelles en microscopie optique (x40, BioMAP)	33
Figure 11: Cycle de développement du pou humain <i>Pediculus humanus</i> (d'après le CDC)	35
Figure 12 : Représentation schématisée de l'affiliation des lactones macrocycliques (adaptée de Prichard et al, 2012 (118))	38
Figure 13 : Structures moléculaires des différentes lactones macrocycliques.....	40
Figure 14 : Structures chimiques des isoxazolines commerciales (lotilaner, afoxolaner, fluralaner et sarolaner)	46
Figure 15 : Structure d'un Ligand-Gated Ion Channel.	50
Figure 16 : Alignement de séquences protéiques de GluCl des nématodes <i>C. elegans</i> (Cel) et <i>H. contortus</i> (Hco) et des insectes <i>A. mellifera</i> (Ame) et <i>D. melanogaster</i> (Dme).	51
Figure 17 : Alignement de séquences protéiques de GABACl des insectes <i>A. mellifera</i> (Ame) et <i>D. melanogaster</i> (Dme).	52
Figure 18 : Structure schématisée d'une synapse. Les ligands représentés par des boules violettes sont libérés de la synapse présynaptique à la suite d'un signal nerveux. Les ligands se fixent sur les récepteurs LGICs présents au niveau post synaptique. Suivant le type de récepteur, leur activation induit un signal activateur (nAChR...) ou inhibiteur (GluCl, GABACl).	53
Figure 19 : Arbre de distance (Neighbour Joining) des séquences protéiques des GluCl de nématodes et d'insectes avec les récepteurs à la glycine de vertébrés.	56
Figure 20 : Courants représentatifs d'un ovocyte de <i>Xenopus laevis</i> exprimant AVR-14B de <i>C. elegans</i> (A), de <i>D. immitis</i> (B) et d' <i>H. contortus</i> (C) en réponse à du glutamate (100µM-10 mM) puis de l'ivermectine (100pM-10 µM) (adaptée de Dent et al, 2000 ; Yates & Wolstenholme, 2004 ; McCavera et al, 2008)	59
Figure 21 : Arbre phylogénétique de distance (BioNJ) de sous-unités de récepteurs au GABA des invertébrés et des vertébrés.	67
Figure 22 : Alignement des séquences protéiques de sous-unités de GABACl des vertébrés <i>Homo sapiens</i> (Hsa) et <i>Canis lupus</i> (Clu), et des invertébrés <i>A. mellifera</i> (Ame), <i>D. melanogaster</i> (Dme) et <i>R. microplus</i> (Rmi)	68
Figure 23 : Alignement des séquences protéiques de sous-unités de RDL, GRD et LCCH3 des insectes <i>A. mellifera</i> (Ame) et <i>D. melanogaster</i> (Dme) et <i>R. microplus</i> (Rmi)	69
Figure 24 : Alignements des domaines transmembranaires 1-3 des GluCl et des GABACl de nématodes et d'insectes avec les sites d'interactions de l'ivermectine et du fluralaner	76
Figure 25 : Alignement de séquences protéiques de GluCl des nématodes <i>C. elegans</i> (Cel) et <i>H. contortus</i> (Hco) et des insectes <i>A. mellifera</i> (Ame) et <i>D. melanogaster</i> (Dme).	78
Figure 26 : Sites d'interactions du glutamate et de l'ivermectine sur GLC-1 de <i>C. elegans</i> (adaptée de Hibbs et Gouaux, 2011 (204))	79
Figure 27 : Site de liaison de la picrotoxine sur GLC-1 de <i>C. elegans</i> (adaptée de Hibbs et Gouaux, 2011 (204))	80
Figure 28 : Acides aminés impliqués dans la sensibilité au fluralaner sur RDL de <i>Musca domestica</i> (adaptée de Yamato et al, 2020 (289))	81
Figure 29: Alignement des séquences protéiques des sous-unités GLC-5 de <i>Parascaris univalens</i> (Pun) et <i>Haemonchus contortus</i> (Hco) avec la sous-unité GLC-1 de <i>Caenorhabditis elegans</i> (Cel)	151
Figure 30: Arbre de distance (BioNJ, Poisson) des séquences protéiques de GluCl (AVR-14, AVR-15, GLC-1, GLC-2, GLC-3, GLC-4 et GLC-5) des nématodes <i>C. elegans</i> (Cel), <i>H. contortus</i> (Hco) et <i>P. univalens</i> (Pun).	153

Figure 31: Arbre de distance (BioNJ, Poisson) montrant la relation des sous-unités GLC-5 de nématodes (<i>Ancylostoma ceylanicum</i> (Ace), <i>Ascaris suum</i> (Asu), <i>Diploscapter coronatus</i> (Dco), <i>Diploscapter pachys</i> (Dpa), <i>Halicephalobus mephisto</i> (Hme), <i>Heligmosomoides polygyrus</i> (Hpo), <i>Panagrellus redivivus</i> (Pre), <i>Parapristionchus gibilindavisi</i> (Pgi), <i>Plectus sambesii</i> (Psa), <i>Steinermia carpocapsae</i> (Sca), <i>Steinermia feltia</i> (Sfe), <i>Steinermia scapterisci</i> (Ssc)) avec les sous-unités de GluCl _s (AVR-14, AVR-15, GLC-1, GLC-2, GLC-3, GLC-4, GLC-5 et GLC-6) des nématodes <i>C. elegans</i> (Cel), <i>H. contortus</i> (Hco) et <i>P. univalens</i> (Pun). Sont également inclus les sous-unités UNC-49 de <i>C. elegans</i> codant pour des récepteurs au GABA.....	154
Figure 32: Expression fonctionnelle de la sous-unité GLC-5 de <i>P. univalens</i> dans des ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	156
Figure 33: Pun-GLC-5 est sensible à une large gamme de lactones macrocycliques	159
Figure 34: Localisation de l'expression du promoteur de <i>Pun-glc-5</i> dans des vers adultes de <i>C. elegans</i>	161
Figure 35: Tests de mobilité montrant la restauration de la sensibilité à l'ivermectine par <i>Pun-glc-5</i> (promoteur et séquence codante) lorsqu'elle est exprimée dans la souche résistante à l'ivermectine JD369	162
Figure 36: Modélisation par homologie de GLC-5 avec liaison au glutamate, à l'iboténate et à l'ivermectine	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Traitements les plus utilisés contre les infestations de poux avec des indications sur leur mode d'action, leur activité adulticide ou ovicide, la gravité des effets secondaires ainsi que les résistances rapportées (adapté de Amanzougaghene et al, 2020).....	36
Tableau 2 : : Gènes et sous-unités décrites à ce jour chez les nématodes <i>C. elegans</i> , <i>C. oncophora</i> et <i>H. contortus</i>	57
Tableau 3 : Résumé des connaissances sur la sensibilité des différents sous-types de GluClS décrits chez les nématodes <i>C. elegans</i> (Cel), <i>C. oncophora</i> (Con), <i>D. immitis</i> (Dim) et <i>H. contortus</i> (Hco). ND signifie Non Déterminé.	58
Tableau 4 : Localisation des sous-unités de GluCl décrites chez les nématodes <i>A. suum</i> , <i>C. elegans</i> , <i>B. malayi</i> et <i>H. contortus</i>	61
Tableau 5: Résumé des connaissances sur la fonctionnalité des GluClS décrits chez les arthropodes	64
Tableau 6: Résumé des connaissances sur la fonctionnalité des sous-unités RDL décrites chez les arthropodes	71
Tableau 7 : Conditions de PCR en fonction de l'ADN polymérase utilisée	92

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Carte du vecteur circulaire pGEM-T avec les sites de restrictions entourant la zone d'insertion (adaptée du manuel technique pGEM TM -T and pGEM TM -T Easy Vector Systems, Promega).	239
Annexe 2 : Carte schématique du vecteur circulaire pCR TM 4-TOPO TM avec les sites de restrictions entourant la zone d'insertion (adaptée du manuel technique pCR TM 4-TOPO TM de Invitrogen).	240
Annexe 3 : Schéma du vecteur circulaire pTB207 avec les sites de restrictions XhoI et ApaI entourant la zone d'insertion. L'expression de la séquence insérée est contrôlée par le promoteur T7. Le 3'UTR de la β -globine de xénope permet la bonne reconnaissance des ARNc par le système de traduction de l'œuf de xénope.	241
Annexe 4 : Carte du vecteur circulaire pPD95.75	242
Annexe 5: Carte du vecteur circulaire pPD96.52	243
Annexe 6: Liste des communications orales.....	244
Annexe 7: Liste des posters	252
Annexe 8: Rédaction d'un article de vulgarisation scientifique pour le site du département de Santé Animal de l'INRAE (Ma thèse en 3500 signes)	254

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	3
Liste DES FIGURES	5
Liste DES TABLEAUX	7
LISTE DES ANNEXES	8
TABLE DES MATIERES	9
INTRODUCTION	14
I. Invertébrés	15
A. Nématodes	15
1. Anatomie	15
2. Evolution.....	17
3. Nématodes libres.....	19
a. <i>Caenorhabditis elegans</i>	19
(i) Distribution	20
(ii) Cycle.....	20
(iii) Un outil pour la Science	22
4. Nématodes parasites	23
a. <i>Brugia malayi</i>	23
(i) Distribution	23
(ii) Cycle.....	23
(iii) Filariose lymphatique	24
(iv) Traitements	25
b. <i>Parascaris sp.</i>	26
(i) Distribution	26
(ii) Cycle.....	27
(iii) Ascaridiose équine.....	28
(iv) Traitement	29
❖ Prophylaxie	29
❖ Anthelminthiques associés à chirurgie	30
B. Insectes	31
1. Anatomie des insectes	31
2. <i>Pediculus humanus humanus</i>	33
a. Distribution.....	33
b. Cycle	34
c. Pédiculose et maladies associées.....	35
d. Traitements	36
II. Les lactones macrocycliques : anthelminthiques et insecticides	37

A.	Découverte	38
B.	Mode d'action	39
C.	Structure	40
D.	Formulation et usage thérapeutique.....	41
1.	Ivermectine.....	41
2.	Abamectine.....	41
3.	Emamectine	42
4.	Eprinomectine	42
5.	Doramectine	42
6.	Sélamectine	42
7.	Moxidectine	43
E.	Résistances aux lactones macrocycliques	43
III.	Isoxazolines	45
A.	Découverte	45
B.	Mode d'action	45
C.	Structure	45
D.	Formulations et usages thérapeutiques	46
1.	Lotilaner.....	46
2.	Afoxolaner	47
3.	Fluralaner.....	47
4.	Sarolaner.....	47
E.	Resistances	48
IV.	Cibles pharmacologiques majeures des invertébrés : les ligand-gated ion channels.....	49
A.	Structure des LGICs	49
B.	Activation des LGICs	53
C.	Voltage-clamp à deux électrodes pour l'étude des canaux ioniques.....	54
D.	Glutamate-gated chloride-channels (GluCl)s	55
1.	GluCl's de nématodes	57
a.	Récepteurs décrits.....	57
b.	Localisation.....	61
c.	Fonctions	63
2.	GluCl's d'insectes	64
a.	Récepteurs décrits.....	64
b.	Localisations et fonctions	65
E.	Récepteurs au GABA des insectes	66
1.	Récepteur RDL (Resistant to Dieldrin)	69
a.	Pharmacologie.....	69
b.	Localisation.....	72

c.	Fonction.....	72
2.	GRD/LCCH3	73
a.	Pharmacologie.....	73
b.	Localisation et fonction	73
3.	8916	74
a.	Pharmacologie.....	74
b.	Localisation.....	74
F.	Sites d'interactions des lactones macrocycliques et des isoxazolines sur leurs cibles pharmacologiques	75
1.	Lactones macrocycliques	77
2.	Isoxazolines.....	81
V.	Projet de thèse	82
	Matériels et méthodes	85
I.	Réactifs et Milieux.....	85
A.	Réactifs et milieux pour biologie moléculaire.....	85
B.	Réactifs et milieux pour électrophysiologie.....	85
C.	Réactifs et milieux pour la culture de <i>C. elegans</i>.....	86
II.	Collecte des nématodes.....	86
A.	<i>Brugia malayi</i>	86
B.	<i>Parascaris sp.</i>.....	86
C.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	87
D.	<i>Pediculus humanus humanus</i>.....	87
III.	Analyses de séquences	88
IV.	Phylogénie.....	89
V.	Méthodes de biologie moléculaire.....	91
A.	Extraction d'ARN.....	91
B.	Rétrotranscription des ARNm	91
C.	Préparation des constructions plasmidiques	92
1.	5' et 3' RACE PCR nichées	92
2.	Amplification des séquences codantes des sous-unités.....	93
3.	Amplification de promoteur	93
4.	Clonage dans pGEM-T/pCR-4	93
5.	Clonage dans pTB207	94
6.	Transformation et criblage de colonies	94
7.	Extraction de plasmides.....	94
D.	Linéarisation des plasmides de transcription.....	95
E.	Transcription d'ARNc <i>in vitro</i>	95
VI.	Electrophysiologie.....	96

A.	Micro-injection en œufs de <i>Xenopus laevis</i>	96
B.	Enregistrements	96
1.	Effets doses agonistes	97
2.	Effets doses antagonistes	97
3.	Effets agonistes des lactones macrocycliques	97
4.	Effets compétiteurs	98
5.	Analyses perméabilité ionique	98
C.	Robocyte II	98
VII.	Manipulation de <i>C. elegans</i>	99
A.	Culture et entretien	99
B.	Microinjection	99
C.	Expression de promoteurs de GluCl de parasites	100
D.	Expression de <i>Pun-glc-5</i> dans <i>C. elegans</i> et tests de mobilité	100
VIII.	Tests de molécules sur les poux <i>in vivo</i>	100
	RESULTATS	101
I.	Etude des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des sous-unités de GluCl conservées chez les nématodes	101
	Contexte	101
	Objectifs	102
	Méthodes	102
	Résultats	102
	Discussion	103
	ARTICLE: Functional investigation of conserved glutamate receptor subunits reveals a new mode of action of macrocyclic lactones in nematodes	104
II.	Mode d'action des lactones macrocycliques sur une sous-unité de canal chlorure glutamate dépendant chez les nématodes parasites <i>Parascaris univalens</i> et <i>Haemonchus contortus</i>	148
	Contexte	148
	Objectifs	149
	Méthodes	149
	Résultats	150
	Discussion	166
III.	Identification et caractérisation des cibles pharmacologiques de l'ivermectine et du lotilaner chez le pou de corps humain <i>Pediculus humanus humanus</i> – Nouvelles perspectives de traitement des pédiculoses	168
	Contexte	168
	Objectifs	169
	Méthodes	169
	Résultats	169
	Discussion	170
	ARTICLE: The molecular targets of ivermectin and lotilaner in the human louse <i>Pediculus humanus humanus</i> – new prospects for the treatment of pediculosis	171

DISCUSSION GENERALE	208
I. Sous-unités de GluCl conservées chez les nématodes	209
A. Sous-unité de GluCl cœurs.....	209
B. Récepteurs homomériques chez les nématodes de clade V	209
C. Un sous-type de GluCl très conservé chez les nématodes : AVR-14B/GLC-2.....	211
D. Nouveau sous-type de GluCl avec des propriétés pharmacologiques originales : GLC-2/GLC-3.....	212
II. Une sous-unité rarement retrouvée chez les nématodes forme un récepteur sensible aux MLs : GLC-5	213
A. GLC-5 de <i>P. univalens</i> forme un récepteur homomérique fonctionnel sensible aux MLs	213
B. Localisation de <i>Pun-glc-5</i>	214
C. Fonction de <i>Pun-GLC-5</i>	214
III. Caractérisation de cibles pharmacologiques du pou de corps humain <i>Pediculus humanus humanus</i> .	215
A. Première caractérisation fonctionnelle de LGICs de poux humains	215
B. Mode d'action des lactones macrocycliques sur les insectes.....	216
C. Isoxazolines : futur pediculicides	217
IV. Résistance aux lactones macrocycliques chez les invertébrés	218
A. Etude de l'impact des mutations point <i>in vitro</i>	218
B. Etude de l'impact des mutations point <i>in vivo</i>	218
CONCLUSION.....	219
REFERENCES	220
Annexes	239

INTRODUCTION

Dans notre société, les parasites invertébrés ont souvent été considérés comme des fléaux, autant pour le monde animal que pour le monde végétal. Leurs cycles de vie parasitaire parfois extrêmement complexes ainsi que leurs morphologies très différentes suivant le stade parasitaire en font de passionnantes créatures pour les chercheurs et les artistes en quête d'inspiration. En effet, les parasites ont grandement inspiré la science-fiction et la religion. Parmi les 10 châtiments que reçut l'Égypte dans les textes bibliques, le troisième fut de transformer chaque grain de poussière en poux ou en moustiques : « Toute la poussière de la terre fut changée en poux, dans tout le pays d'Égypte [...] les poux étaient sur les hommes et sur les animaux. » (Ancien Testament, Exode 8). Les larves extraterrestres des films « Alien » ont besoin d'un hôte humain pour se reproduire avec plusieurs stades de développement à morphologies très différentes (**Figure 1**). De même, la saga « Starship Troopers » raconte le combat de l'humanité contre leur plus grand ennemi : les Parasites.

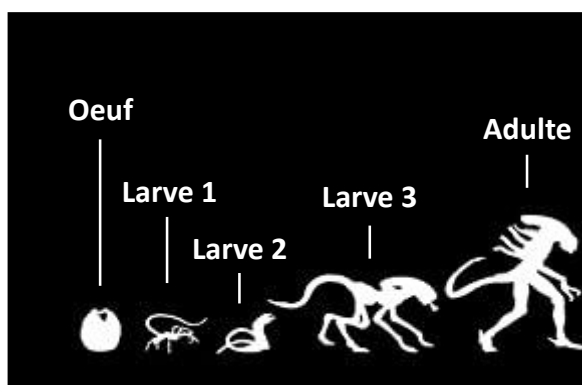


Figure 1: Cycle de vie Alien (adaptée de Magnets N More)

Dans le cadre de ce travail de thèse, mon objectif était d'élucider le mode d'action sur les parasites invertébrés (insectes et nématodes) d'une famille d'antiparasitaire remarquable : les lactones macrocycliques, dont fait partie l'ivermectine (William C. Campbell et Satoshi Omura, prix Nobel de Médecine en 2015). Les lactones macrocycliques qui sont efficaces sur les acariens, les insectes et les nématodes sont utilisées en médecine humaine, vétérinaire (élevage de bétail, pisciculture...) ainsi qu'en agriculture. Elles paralysent les invertébrés en ciblant principalement les canaux chlorure glutamate-dépendant (GluCl). Cependant, l'utilisation massive de cette famille de molécules a entraîné l'émergence de résistance et a rendu le contrôle du parasitisme plus compliqué. De plus, le mode d'action et les cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques restent largement méconnus chez des parasites pourtant très pathogènes pour l'Homme (*Brugia malayi*, *Pediculus humanus*) et les animaux (*Parascaris* sp.). L'identification des cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques ainsi qu'une meilleure caractérisation de leur mode d'action est donc urgente pour comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance et préserver l'efficacité de cette famille de molécule. Ce travail de thèse décrit de nouveaux sous-types de GluCls d'insectes et de nématodes ciblés par les lactones macrocycliques et améliore notre compréhension de la physiologie et de la pharmacologie de ces récepteurs.

I. Invertébrés

Les invertébrés représentent la majeure partie du règne animal et regroupent une importante biodiversité d'organismes très différents autant d'un point de vue évolutif, morphologique ou physiologique. Ils sont retrouvés dans tous les milieux, aussi bien au niveau terrestre que dans les eaux douces ou au niveau marin. Les insectes et les nématodes sont les deux groupes qui comptabilisent le plus grand nombre d'espèces décrites dans le monde animal. Certains ont un mode de vie libre tandis que d'autres ont un mode vie parasitaire impactant gravement la santé humaine, animale et les végétaux (1).

A. Nématodes

Les nématodes sont des vers ronds non segmentés faisant partie d'un phylum du règne animal très ancien et très diversifié. En effet, en terme de nombre d'individus et de diversité d'espèces, les nématodes peuvent être les animaux les plus abondants dans certaines zones, que ce soit au niveau terrestre ou marin (2). Chez l'Homme, il est estimé que la plupart des individus seront parasités par un nématode au cours de leur vie avec un quart à un tiers de la population mondiale infestée à chaque instant (2). A ce jour, plus de 26 000 espèces ont été décrites (3) mais il est estimé qu'il y a plus d'un million d'espèces différentes (2) dont presque 300 000 rien qu'en nématodes parasites (4). Cette diversité d'espèces est associée à une grande diversité de tailles et de modes de vie.

Les vers les plus petits ne font que quelques centaines de micromètres tandis que les plus gros peuvent faire plusieurs mètres. Les nématodes ont colonisé un grand nombre d'écosystèmes. Ils sont retrouvés dans les eaux douces ou salées ainsi que dans les milieux les plus extrêmes tels que dans les déserts ou dans le permafrost. Certains nématodes ont un mode de vie libre comme *Caenorhabditis elegans*, qui est retrouvé dans les sols avec une préférence de vie autour des champignons et des racines de plantes (5), alors que d'autres sont des parasites inféodés à une seule famille ou à une seule espèce tels que *Parascaris sp.* qui est spécifique des équidés. Les nématodes parasitent presque l'entièreté des espèces vivantes: sauf exceptions, aucun animal (Hommes, oiseaux, insectes, reptiles, animaux marins...) ou plantes (terrestre ou marines) ne sont épargnés (4).

1. Anatomie

Malgré leur grande diversité de mode de vie et de diversité phylogénétique, les nématodes ont tous une organisation simple avec un corps cylindrique commençant par une tête et se terminant par une queue. En se basant sur le nématode modèle *C. elegans*, le corps des nématodes est composé d'une cuticule, d'un tube digestif, d'un système reproducteur et d'un système nerveux simple. En revanche, ils ne possèdent pas de système circulatoire ni de système respiratoire (6) (**Figure 2**).

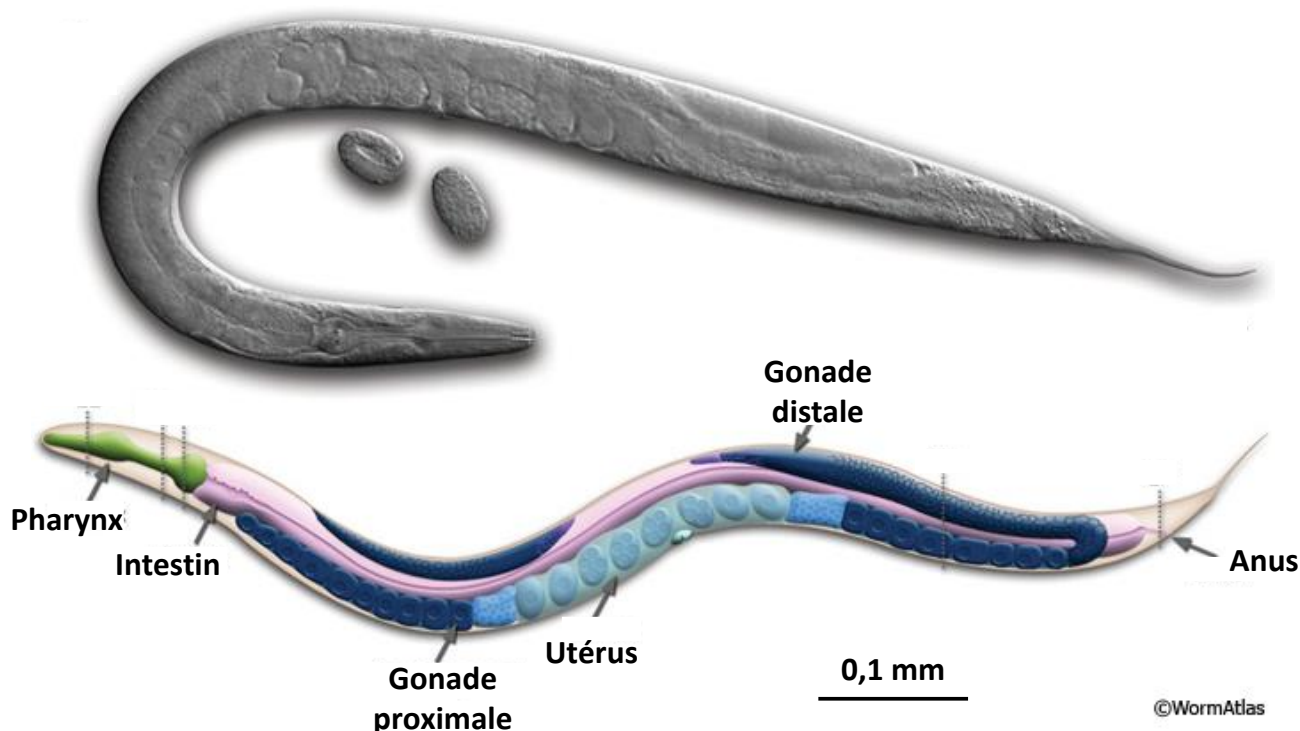


Figure 2 : Anatomie d'un *C. elegans* hermaphrodite (adaptée de WormAtlas)

A ce jour, la digestion des aliments chez les nématodes reste peu connue et peu étudiée. Le système digestif est divisé en trois parties. La première comprend la cavité buccale qui est formée de plusieurs lèvres dont le nombre dépend de l'espèce, et le pharynx qui sert de système de pompage nécessaire à l'ingestion d'aliments. La forme du pharynx est également variable et dépend du stade de développement ainsi que du mode vie du nématode. C'est également le système de pompage du pharynx qui permet un broyage des aliments et qui les acheminent le long de l'intestin (7). L'intestin est connecté à l'anus qui s'ouvre à la suite d'une contraction musculaire de muscles spécifiques (8).

C. elegans pratique généralement l'autofécondation et donne une descendance de femelles hermaphrodites. Dans des conditions de stress, des mâles peuvent naître ce qui favorisera le brassage génétique de la population et ainsi augmentera les chances d'avoir une descendance plus apte à survivre dans ces conditions de stress. Le système reproducteur des femelles hermaphrodites se compose de 2 gonades présentes de chaque côté du vers qui sont reliées à une vulve permettant la ponte. Pour les mâles, une seule gonade reliée à un spicule nécessaire à la fécondation est présente (8).

Les nématodes ont également un système de sécrétion/excrétion impliqué dans leur maintien osmotique. Des cellules excrétrices sont présentes dans tout le corps et sont reliées à un pore excréteur. Les produits excrétés forment une couche protectrice autour de la cuticule, protégeant les nématodes des agressions extérieures et empêchant la bonne action du système immunitaire de l'hôte dans le cas des nématodes parasites (8).

Les nématodes possèdent un système nerveux simple de faible niveau d'organisation. Un anneau nerveux plus ou moins fourni en cellules nerveuses est présent à différentes localisations suivant chaque nématode mais toujours autour du pharynx. Des cordons nerveux dorsaux et ventraux partent de l'anneau nerveux et longent parallèlement tout le corps de la tête jusqu'à la queue avec des prolongements entourant le corps du nématode. Le système nerveux est complété par des neurones du système nerveux central et des neurones moteurs (6).

2. Evolution

La classification des nématodes sur des critères morphologiques a évolué au profit de leur classification sur des critères de marqueurs moléculaires. Les nématodes font partie du superphylum des Ecdysozoaires qui regroupent les organismes dont le développement passe par des mues cuticulaires (9). Les embranchements les plus connus des Ecdysozoaires sont ceux des nématodes (*Nematoda*) et des arthropodes (*Arthropoda* : crustacés et insectes) dont chaque phyla est notamment différencié par la nature moléculaire de la cuticule ainsi que par les processus par lesquels s'effectuent la mue.

Il est intéressant de noter qu'avec cette classification, les nématodes sont divisés en deux phylums qui sont les *Nematoda* et les *Nematomorpha*. Les *Nematomorpha* représentent un groupe d'espèces exclusivement parasites d'arthropodes terrestres et marins. Les larves vivent dans le corps de leur hôte qu'elles tuent une fois bien développées. Les adultes ont un mode de vie libre et pondent des œufs dans leur habitat. La contamination de nouveaux hôtes se fait par ingestion d'œufs (2). A l'inverse, le groupe des *Nematoda* ne regroupe pas que des vers parasites mais inclue également des vers à mode de vie libre.

Des analyses phylogénétiques basées sur la séquence de la petite sous-unité ARNr (**Figure 3**) montrent que les nématodes sont divisés en 6 clades (I, II, C, III, IV et V correspondant respectivement aux clades Dorylaimia, Enoplia, Chromadoria, Spirurina, Tylenchina et Rhabditina) qui se différencient par des morphologies et des modes de vie différents (2,10). Cette classification a été validée par des analyses phylogénétiques plus larges se basant sur 181 gènes codant pour des protéines **Figure 4** (2).

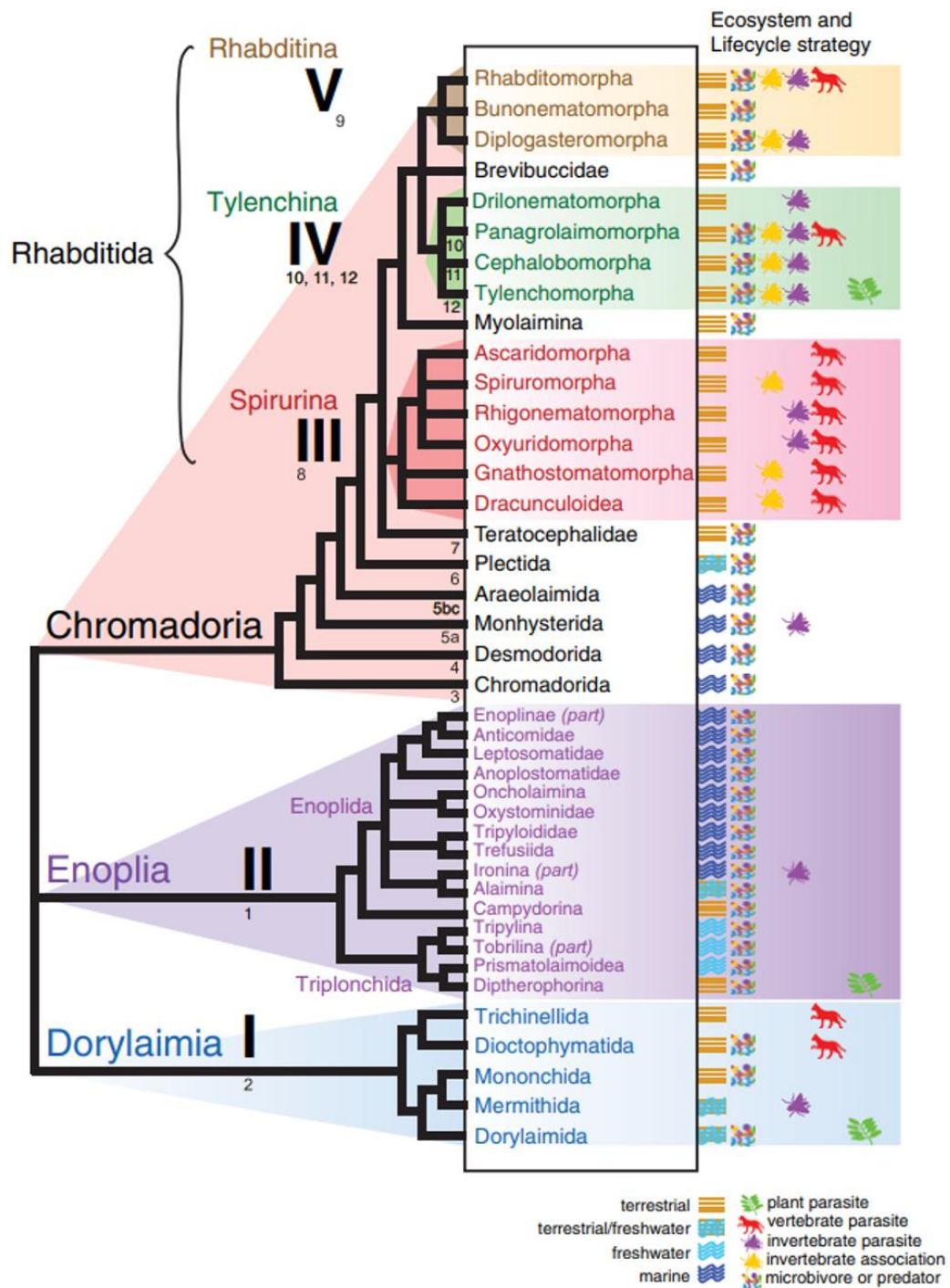


Figure 3 : Arbre phylogénétique des Nématodes basé sur des analyses de la petite sous-unité des ARNr avec les clades indiqués (adaptée de Blaxter et al, 2015)

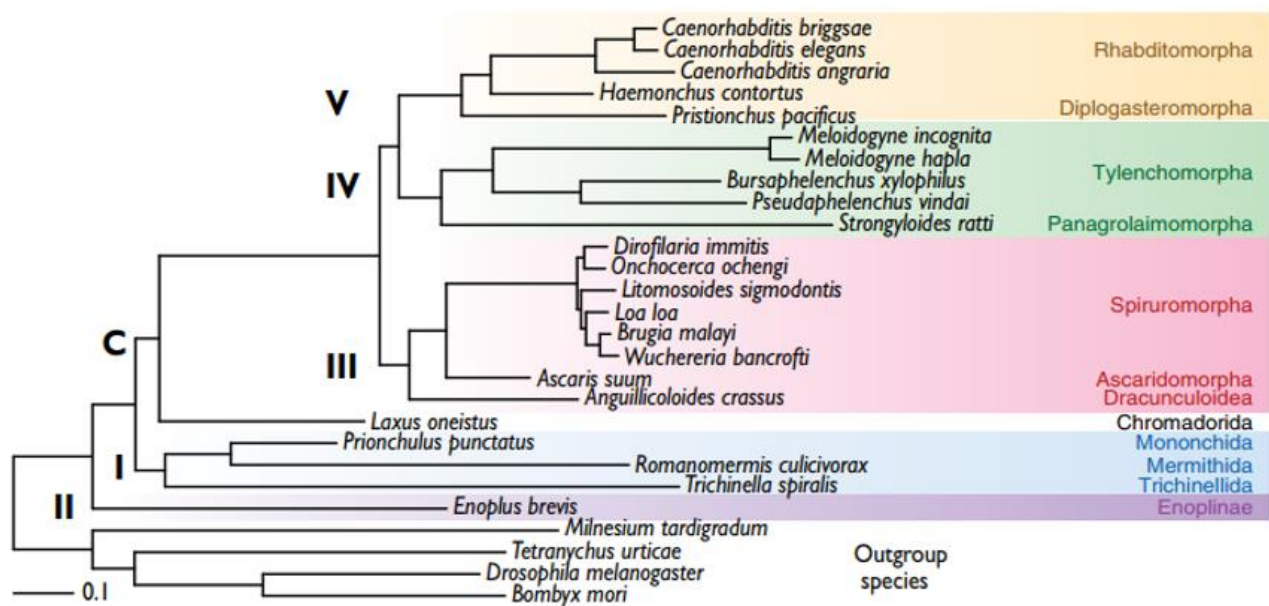


Figure 4 : Arbre phylogénétique des Nématodes basé sur des analyses de 181 gènes codant pour des protéines de 23 espèces de nématodes et 4 espèces d'Ecdysozoaires utilisées comme outgroup avec les clades indiqués (adaptée de Blaxter et al, 2015)

3. Nématodes libres

Parmi les différentes espèces de nématodes décrites, 10 681 espèces sont des nématodes à mode de vie libre (soit 40 % des nématodes) (3). Ils sont retrouvés en milieux aquatiques dans les fonds océaniques et au niveau terrestre dans les sols. Ils participent à l'écosystème de leur milieu en recyclant la matière organique. Le séquençage du génome des nématodes du genre *Caenorhabditis* tels que le nématode modèle *C. elegans* (11) et *C. briggsae* (12) a facilité leur étude et a permis un grand nombre d'avancées scientifiques dans bien des domaines (génétique, biologie du développement...).

a. *Caenorhabditis elegans*

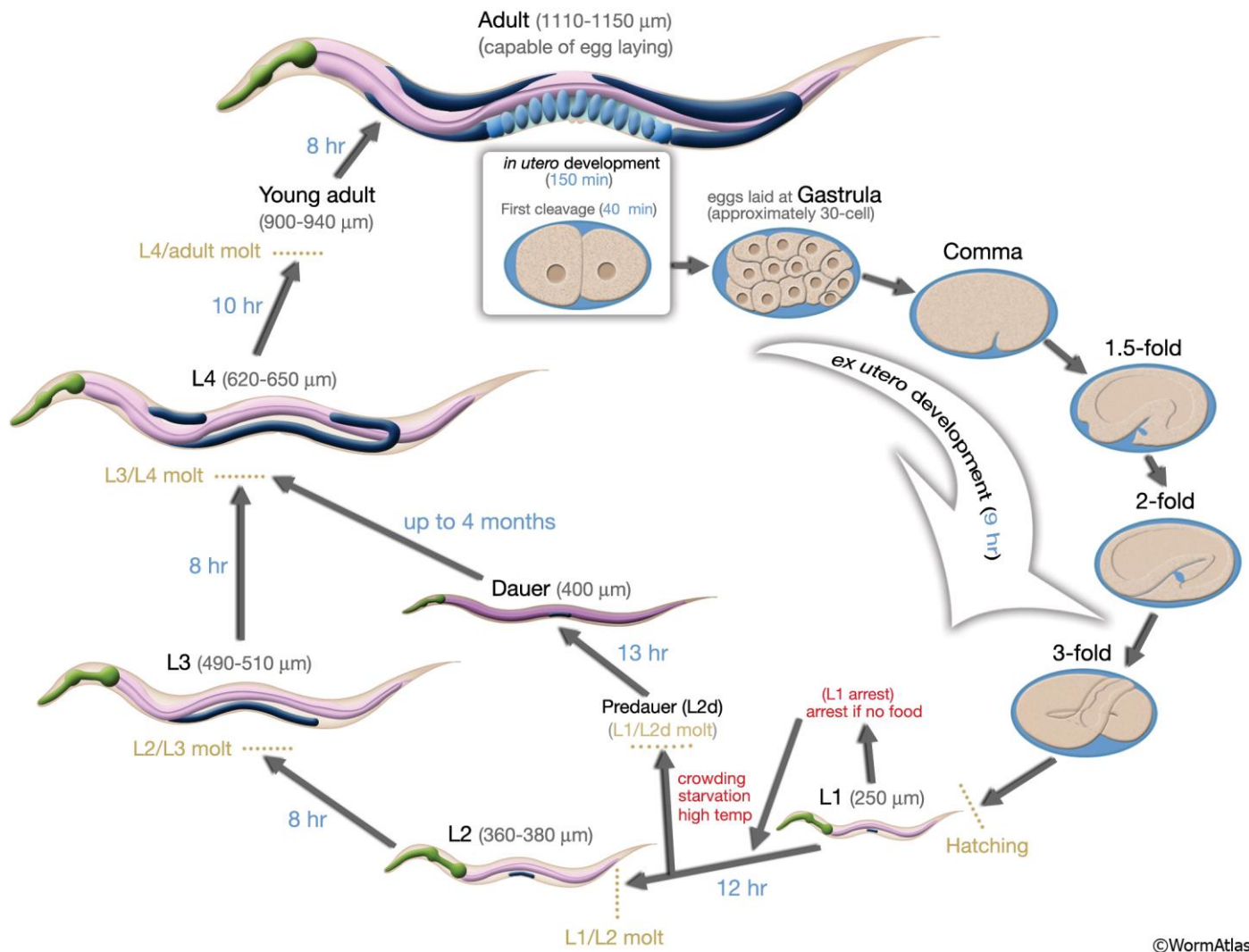
Le nématode libre *C. elegans* (Figure 2) est une pierre angulaire en termes de nouvelles découvertes et de connaissances écologiques et biologiques. C'est un organisme modèle qui a permis de grandes découvertes dont trois ont été récompensées par des prix Nobel. Sydney Brenner, John Sulston et Robert Horvitz ont reçu le prix Nobel de Physiologie/Médecine en 2002 pour la description de l'apoptose. En 2006, c'est Andrew Z. Fire et Craig C. Mello qui reçoivent le prix Nobel de Physiologie/Médecine pour leurs travaux sur l'ARN interférence. Enfin, Martin Chalfie, Osamu Shimomura et Roger Tsien reçoivent le prix Nobel de Chimie en 2008 pour le développement de la Green Fluorescent Protein (GFP) qu'ils ont exprimées pour la première fois dans un organisme eucaryote : *C. elegans*. De plus *C. elegans* est beaucoup utilisé en tant que modèle génétique pour les études sur la reproduction, le développement embryonnaire, etc... (13).

(i) Distribution

Ce ver appartient au clade V des nématodes (**Figure 4**) et est retrouvé partout dans le monde (même dans des îles isolées) sauf en Antarctique. Des centaines de souches de *C. elegans* ont été identifiées dont les variations dépendent plus de leur environnement que de leur localisation géographique (14). Bien que souvent décrit comme un nématode du sol, il est le plus souvent retrouvé au niveau des racines de champignons ou dans des fruits en décomposition (5). Il est intéressant de noter que malgré ces variations génétiques, *C. elegans* est un organisme qui a un faible taux de mutations comparé à d'autres organismes comme *Drosophila melanogaster* (20 fois plus de polymorphismes) (15). Cela peut s'expliquer par son mode de reproduction majoritairement hermaphrodite (et donc sans reproduction sexuée) qui ne favorise pas le brassage génétique.

(ii) Cycle

C. elegans est un nématode hermaphrodite possédant un cycle de vie court de 3 jours. Un ver adulte pond des œufs dans l'environnement qui après un court développement embryonnaire éclosent en larve L1. Les larves subissent plusieurs mues successives pour devenir progressivement des larves L2, L3, L4 et enfin atteindre le stade adulte si les conditions sont favorables. En effet, ce ver possède un système de survie permettant à la larve L2 d'entrer dans un stade « dauer » très résistant aux stress environnementaux (température, appauvrissement de l'environnement en nutriments...) lui permettant de survivre plusieurs mois sans se nourrir en attendant des conditions de milieux plus favorables pour son développement (**Figure 5**) (13).



©WormAtlas

Figure 5: Cycle de développement de *C. elegans* (figure issue de WormAtlas)

(iii) Un outil pour la Science

A l'heure actuelle, la manipulation d'une grande majorité de nématodes parasites reste très difficile voire impossible à cause de la difficulté à acquérir certains stades parasitaires. Par conséquent, *C. elegans* représente une alternative pertinente pour étudier des processus biologiques de nématodes parasites ou pour le développement de nouveaux composés aux propriétés anthelminthiques. En effet, *C. elegans* a un temps de génération très court, est facilement manipulable avec une loupe binoculaire et se cultive facilement en boîte de Pétri sur une gélose simple (gélose Nematode Growth Medium NGM). Cette facilité de manipulation a permis à la communauté de scientifiques travaillant sur *C. elegans* de créer et de partager de nombreux « mutants » (souches ou lignées porteuses de mutations génétiques) associés à différents phénotypes. Cela a notamment permis l'identification et la caractérisation de cibles pharmacologiques (canaux ioniques) et de processus physiologiques (apoptose, ARN interférence...). De plus, sa transparence en fait un bon modèle d'étude pour faire de l'imagerie. Aussi, son génome fut le premier génome animal entièrement séquencé (depuis 1998) (11) et de nombreuses annotations sont disponibles ([WormBase](#), [WormAtlas](#)). Cela en fait un excellent modèle pour l'expression hétérologue de gènes de parasites permettant leur étude fonctionnelle. Ainsi, ce nématode a permis la caractérisation de nombreuses cibles pharmacologiques (nAChR, GluCl...) ainsi que le développement de nouveaux traitements anthelminthiques (16). Il a également permis d'observer la localisation de l'expression de certains récepteurs (17) et de montrer leur implication dans la sensibilité du ver à l'ivermectine (18). La difficulté d'obtention et de manipulation de vers parasites tels que *Brugia malayi* et *Parascaris sp* font de *C. elegans* un système d'expression hétérologue majeur pour l'identification et la caractérisation de cibles pharmacologiques de parasites (19).

4. Nématodes parasites

Les nématodes parasites représentent 60 % des espèces de nématodes décrites soit plus de 15 000 espèces (3). Ils parasitent les plantes (20), les invertébrés et les animaux incluant l'Homme (2). Leur impact en santé humaine et animale ainsi qu'en agriculture et en production végétale engendre de graves handicaps ainsi que de fortes pertes économiques dans les élevages. Leur taille est variable, allant de quelques millimètres (filaires) à quelques mètres (ascarides) suivant l'hôte et l'espèce.

a. *Brugia malayi*

(i) Distribution

Brugia malayi est un nématode parasite de la famille des *Filaroidae* qui appartient aux nématodes de clade III (**Figure 4**). Avec *Wuchereria bancrofti* (responsable de 90% des infestations) et *Brugia timori* (infestations rares), *B. malayi* (+/- 10 % des infestations) est responsable de la filariose lymphatique (éléphantiasis) chez l'Homme notamment en Asie du Sud et du Sud-Est. Dans de plus rares cas, *B. malayi* est retrouvé chez les félins ou les singes bien que l'Homme soit l'hôte définitif préférentiel (21).

(ii) Cycle

L'infestation se transmet par cinq genres de moustiques (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia* et *Ochlerotatus*) dépendant de la localisation et du type de parasite transporté. Pour *Brugia malayi*, seuls les moustiques du genre *Mansonia* (*M. annulifera*, *M. uniformis* et *M. indiana*) ont été décrits comme transmettant les microfilaires (22,23). Les microfilaires sont le stade embryonnaire du parasite. Elles mesurent de 205 à 240 µm (23), vivent dans les différents organes de l'hôte et circulent dans le sang. Les moustiques ingèrent les microfilaires lors d'un repas sanguin qui se développent jusqu'au stade L3 en 10 à 12 jours dans l'intestin du moustique (24). Les larves migrent dans la trompe du moustique et infestent un autre humain lors du prochain repas sanguin du moustique. Les larves présentes sur la peau de l'hôte migrent à travers la peau, puis rejoignent le système lymphatique où elles s'y développent jusqu'au stade adulte pendant 6 à 12 mois. Les vers adultes se concentrent dans les vaisseaux et les nœuds lymphatiques et perturbent leurs fonctions (**Figure 6**). Les femelles mesurant autour de 60 mm sont plus grandes que les mâles mesurant 25 mm (25). Les femelles vivent plusieurs années et produisent des millions de microfilaires qui migrent dans la circulation sanguine en attendant d'être aspirées par un moustique.

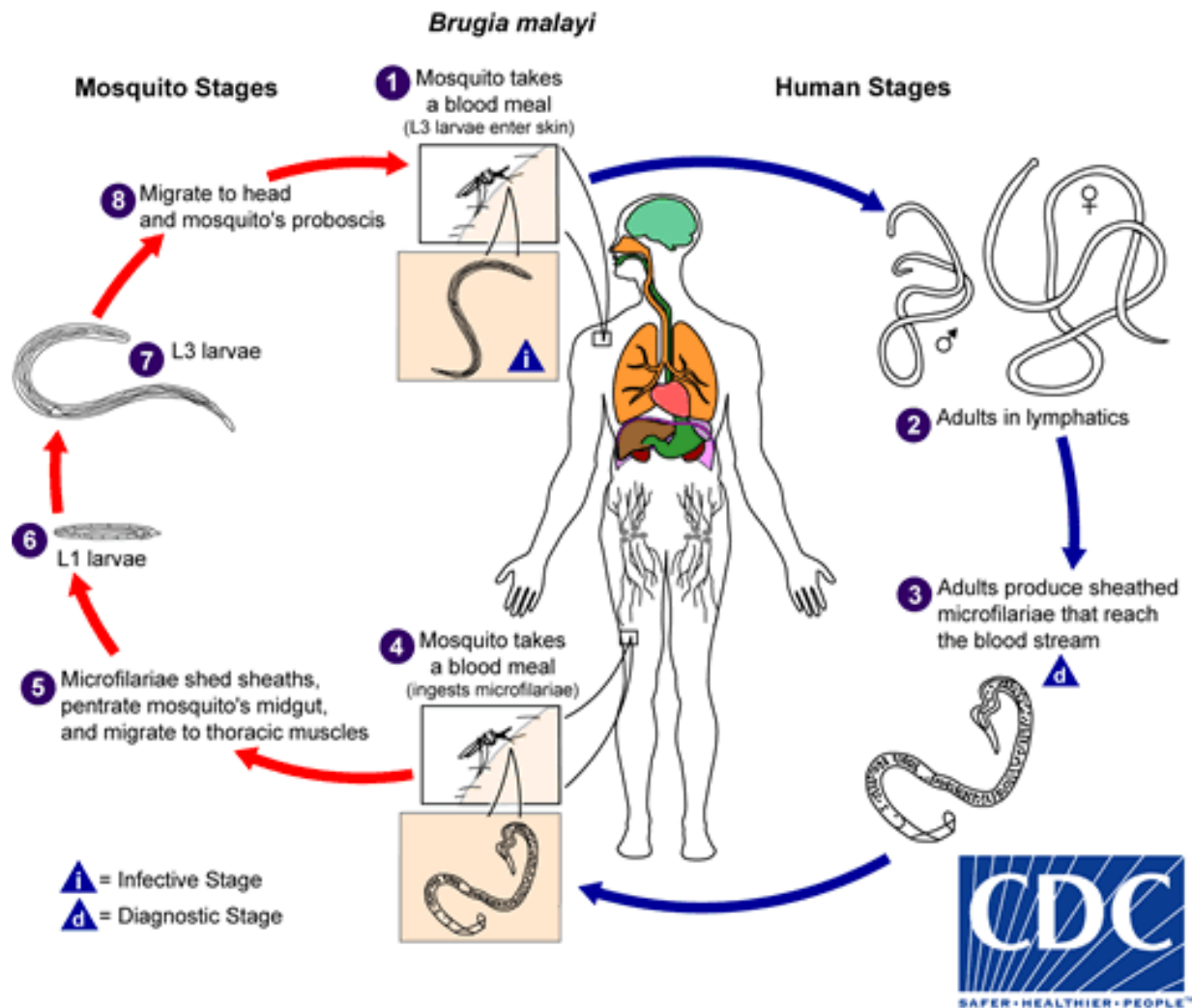


Figure 6: Cycle de développement de *Brugia malayi* (issue du Centre pour le contrôle et la prévention des maladies, CDC)

(iii) Filariose lymphatique

La filariose lymphatique est une maladie tropicale négligée transmise par les moustiques. Elle peut être provoquée par au moins trois nématodes parasites : *B. malayi* (25), *Brugia timori* (26) et *Wuchereria bancrofti* (27–29). Cependant, tous diffèrent par leur morphologie, les symptômes qu'ils engendrent et leur localisation géographique. La surpopulation de vers adultes et de microfilaries dans les tissus lymphatiques entraîne des lymphœdèmes (blocage du drainage lymphatique) et des hydrocèles (accumulation de fluide lymphatique dans le scrotum). Les gonflements des membres et des tissus s'accompagnent de douleurs avec des handicaps sévères comme des difficultés à se déplacer (30). Le gonflement des différents tissus engendre de grosses difformités handicapantes mais ont également un impact dans la stigmatisation sociale.

Les foyers endémiques sont observés en Afrique, en Asie, dans le Pacifique et en Amérique (31) et correspondent aux foyers de présence des vecteurs. Depuis 2000, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a commencé un programme mondial d'élimination de la filariose lymphatique par administration massive de médicaments dans chaque zone d'endémie une à deux fois par an. Avant que l'OMS n'organise ce plan d'éradication, il a été estimé qu'1,3 milliards de personnes vivaient en zone d'endémie dans 73 pays avec 130 millions de personnes touchées par la maladie. En 2014, 13 ans après la mise en place du programme d'éradication, le nombre de zones endémiques ainsi que le nombre de personnes infestées a fortement diminué avec une estimation de 68 millions de personnes touchées soit moitié moins qu'au début des années 2000 (31). Selon le rapport de situation sur la filariose lymphatique de l'OMS de 2019 (portant sur l'année 2018), cette maladie pose encore des problèmes de santé publique dans 48 pays en zone d'endémie (32). Cela représente presque 900 millions de personnes qui ont besoin de traitements curatifs ou préventifs. Après 16 ans de programme, 25 pays ont drastiquement diminué la prévalence de la maladie et ne nécessitent plus d'administrations massives pour contrôler la maladie. Certains pays, comme la Thaïlande (33), n'ont presque plus de cas de filariose lymphatique à la suite de ce programme et l'ont éliminée comme enjeu de santé publique. En plus de l'amélioration de la santé des personnes en zones d'endémies, des répercussions économiques ont été observées avec une estimation de 70 à 150 milliards de dollars économisés, comprenant les pertes de revenus à cause d'absentéisme ainsi que les dépenses médicales des patients et des systèmes de santé (34,35).

(iv) Traitements

La filariose lymphatique est un problème de santé publique qui est principalement contrôlé par une chimiothérapie préventive. La combinaison de l'albendazole avec la diethylcarbamazine (DEC) est utilisée dans les zones d'endémies et la combinaison de l'albendazole avec l'ivermectine est utilisée dans les zones de co-endémies avec l'onchocercose, causée par un autre nématode parasite filaire *Onchocerca volvulus*. La stratégie du programme d'éradication de la filariose lymphatique est de fournir ces traitements de prévention à toutes les personnes présentes en zone d'endémie une à deux fois par an. A l'heure actuelle, le meilleur traitement curatif contre *B. malayi* est une tri-thérapie avec les trois seules molécules efficaces que sont l'ivermectine, l'albendazole et la diethylcarbamazine (36). Ces molécules ont un effet limité sur les vers adultes mais sont très efficaces contre les microfilaries circulant dans le sang ce qui diminue la charge parasitaire et limite la transmission par les moustiques.

La lutte antivectorielle est une stratégie complémentaire à l'administration massive d'anthelminthiques. Comme dans le cas de la malaria transmise par les moustiques, l'OMS recommande l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides ainsi que la pulvérisation d'insecticides à l'intérieur des habitations pour limiter la transmission de la filariose lymphatique (37–39).

Des actes de chirurgies de l'hydrocèle sont parfois nécessaires après traitement de la filariose lymphatique par chimiothérapie.

b. *Parascaris sp.*

(i) **Distribution**

Parascaris sp. est un nématode parasite de la famille des *Ascaridoidae* appartenant au clade III des nématodes (**Figure 4**). Il est le plus grand nématode parasite infestant les équidés (chevaux, poneys, ânes...) et inféodé à l'intestin grêle (40). Au stade adulte, c'est un ver blanc mesurant de 10 à 50 cm de long (**Figure 7**). Deux espèces de *Parascaris sp.* ont été décrites : *Parascaris equorum* et *Parascaris univalens*. Ces deux espèces sont morphologiquement identiques et ne se différencient que par leur nombre de chromosome ; *P. univalens* en ayant une paire et *P. equorum* en ayant deux paires (41). Aujourd'hui, *P. univalens* semble être l'espèce prédominante partout dans le monde. Cependant, les données de séquençage de l'ADN mitochondrial remettent en question la différenciation de ces deux espèces qui ne pourrait finalement n'en être qu'une seule (42).



Figure 7 : Photographie d'un ver *Parascaris sp.* adulte récupéré dans les fèces de poulains après traitement à l'ivermectine

Les infestations liées à *Parascaris sp.* sont très courantes dans les élevages et dans les populations d'animaux sauvages, partout dans le monde, quelle que soit la saison, bien que des pics d'infestations sont observés à la fin de l'été et en automne. Une étude de la prévalence de *Parascaris sp.* sur 15 fermes d'élevages françaises a montré qu'aucune des fermes n'était exempte d'infestation avec 6,9 à 76,2 % des poulains qui étaient infestés (43). Ces infestations touchent surtout les poulains et les jeunes chevaux de moins de deux ans qui ont un système immunitaire immature ne leur permettant pas de lutter efficacement contre les infestations. Après deux ans, le système immunitaire met en place une réponse adaptative efficace qui rend l'infestation bénigne. Ainsi, les fortes infestations sont surtout limitées aux poulains et chevaux de moins de 2 ans. Cependant, les chevaux adultes peuvent également être infestés et participent donc à la contamination des plus jeunes (44).

(ii) Cycle

Parascaris sp. a un cycle monoxène avec une partie du développement dans l'environnement (**Figure 8**). Les vers adultes sont localisés dans l'intestin grêle proximal (duodénum et jéjunum proximal) qui un organe à pH neutre et où les aliments prédigérés fournissent les nutriments nécessaires à la survie du parasite. Les femelles y pondent leurs œufs qui sont transportés dans l'environnement en même temps que l'évacuation des fèces de l'animal. Une fois sortie de l'hôte, les larves, nommées larves L1 puis L2, se développent dans les œufs. L'infestation des poulains se fait par ingestion des œufs embryonnés présents dans les fourrages, les sols, l'eau etc... Les larves éclosent à leur arrivée dans l'intestin grêle du cheval. S'ensuit plusieurs migrations des larves pour acquérir leur stade adulte. En passant par la circulation sanguine, les larves migrent en premier dans le foie (stade L3) puis dans les poumons et dans les alvéoles (stade L4) avant de repasser dans le tractus digestif. De retour dans l'intestin grêle, les larves subissent une dernière mue pour atteindre le stade adulte. Ces migrations dans l'animal sont à l'origine de nombreuses petites lésions des organes du cheval, comme le foie (45) ou les poumons (46), et entraînent des troubles digestifs et respiratoires chez l'animal. Ces nématodes pratiquent la fécondation interne et amphimixique (47). La ponte des œufs commence 75 à 80 jours après la première infestation.

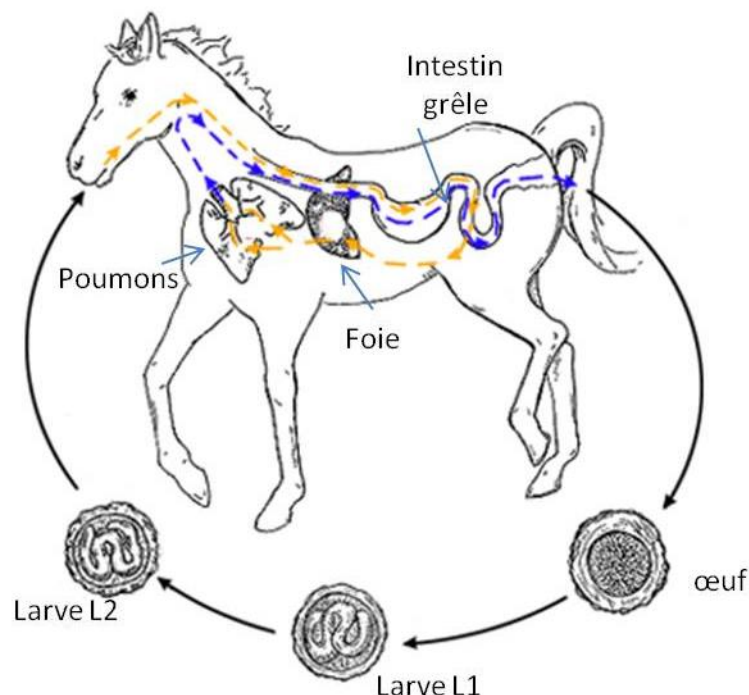


Figure 8 : Cycle de développement de *Parascaris sp.* dont le stade adulte est retrouvé dans l'intestin grêle (adaptée de Merial)

(iii) Ascaridiose équine

Parascaris sp. est responsable de l'ascaridiose équine qui se traduit par un mauvais état général de l'animal. Des troubles respiratoires et digestifs avec des jetages nasals (saignement, présence d'écume autour des nasaux, difficulté à respirer) et des coliques d'impaction sont observés (48), dus à la migration des larves au cours de leur développement (45–47). *Parascaris sp.* est un parasite excréteur de nombreuses molécules comme des inhibiteurs de protéases (49) qui peuvent être impliqués dans les troubles digestifs de l'animal ainsi que dans les phénomènes d'interactions hôte-pathogène induisant une certaine tolérance de l'hôte (50). Dans les cas les plus graves, dû à la surpopulation et à la grande taille des vers (jusqu'à 50 cm), des obstructions intestinales peuvent survenir. Les obstructions peuvent perforer l'intestin, conduisant à la mort de l'animal s'il n'est pas pris en charge rapidement (51,52). De plus, bien que les vers pris individuellement ne consomment que peu de ressources, la surpopulation entraîne des carences en glucides, vitamines, acides aminés et en minéraux responsables de fatigues intenses, de coliques et de retards de croissance chez les poulains (44).

Parascaris sp. est un nématode très mobile pouvant migrer dans les voies pancréatiques ou le foi et provoquer des ascaridioses erratiques des voies biliaires ou du pancréas (47) avec de grave conséquences cliniques. De plus, bien que *Parascaris sp.* ne s'attache généralement pas à la paroi intestinale, il possède 3 lèvres au niveau de la tête qui lui permettent de se nourrir et parfois de s'accrocher à l'intestin (53) ce qui entraîne des lésions. En combinaison avec les migrations, les mouvements de ce ver favorisent les surinfections bactériennes. La maladie entraîne des retards de croissance des poulains et une baisse des performances nécessaires pour les courses hippiques. Cela impacte la santé des chevaux, pouvant parfois engager leur pronostic vital, et entraîne des pertes économiques pour les éleveurs dues aux baisses de performances et au coût des traitements vétérinaires. Le contrôle de ce parasite se fait par l'utilisation de traitements anthelminthiques ainsi que par la mise en place de certaines pratiques d'élevages.

(iv) Traitement

❖ Prophylaxie

Améliorer le contrôle du parasitisme peut commencer en ayant recours à de bonnes pratiques d'élevage. *Parascaris sp.* ayant une phase de développement dans l'environnement, agir à ce niveau-là permet de lutter efficacement contre le parasitisme sans utiliser de traitements chimiques. Une bonne hygiène générale de l'environnement (box) ainsi qu'une bonne alimentation limitent les risques de contamination (54). Les œufs de *Parascaris sp.* survivent longtemps dans l'environnement et résistent autant à de fortes chaleurs qu'à de basses températures (55) ainsi qu'aux traitements chimiques (javel, détergents...). Cependant, l'utilisation de compost dans les box favoriserait à rendre les œufs non viables du fait de l'augmentation rapide de la température due à l'activité des autres microorganismes (56).

Une bonne gestion du pâturage permet également de limiter les infestations en séparant les poulains des jeunes chevaux qui peuvent être excréteurs asymptomatiques. A l'arrivée d'un nouvel animal, en cas de doute sur le niveau d'infestation, il est préférable de mettre l'animal en quarantaine et de le vermifuger en contrôlant le niveau d'excrétion des œufs par des tests coprologiques (EPG : évaluation du nombre d'œufs par gramme de fèces). Aussi, le pâturage mixte des chevaux avec des bovins permet de diminuer le niveau d'infestation des animaux grâce à un phénomène de dilution et donc de diminution de la charge parasitaire dans les pâturages (57).

Bien que ces méthodes améliorent le contrôle du parasitisme, les traitements anthelminthiques restent le fer de lance du contrôle des nématodes parasites.

❖ Anthelminthiques associés à chirurgie

Les mesures de prophylaxie ne peuvent remplacer l'utilisation d'anthelminthiques. Trois familles de molécules sont utilisées en routine pour lutter contre *Parascaris sp.* : les benzimidazoles (fenbendazole et oxibendazole), le pyrantel (pyrantel pamoate et pyrantel tartrate) et les lactones macrocycliques (ivermectin et moxidectin) (48). Les pratiques de traitement varient selon les pays et les élevages (58). En absence de consensus, il est recommandé aux éleveurs d'ajuster leurs pratiques d'élevage et de traitements en suivant l'adage « traiter aussi peu que possible, mais aussi souvent que nécessaire » (P. Camuset, SNGTV 2017). Les éleveurs doivent jongler entre une utilisation régulière d'anthelminthiques en cas de fortes infestations, qui est souvent multi-espèces (59), et une utilisation d'anthelminthiques plus limitée pour ne pas favoriser l'apparition de résistance et permettre le maintien de « refuge sensible » (60). Les poulains et les chevaux sont traités en routine de façon cyclique dépendant du type de nématodes parasites infestant. Pour *Parascaris sp.*, aux Etats-Unis, les poulains sont traités de façon bimensuelle à partir de deux mois. En Europe, il est plutôt recommandé de traiter entre la fin de l'été et le début de l'automne, au moment où l'infestation à *Parascaris sp.* est la plus forte. Le mieux est de varier les molécules utilisées afin de ne pas appliquer une pression de sélection trop forte sur un élevage. Dans le meilleur des cas, une utilisation plus raisonnée des anthelminthiques avec une thérapie au cas par cas est préférable. En effet, le contrôle du niveau d'infestation par des coproscopies permet de sélectionner les poulains très infestés à traiter en priorité de ceux qui sont peu infestés. Bien que plus difficile à mettre en place, ce contrôle au cas par cas limite l'apparition et la propagation de parasites résistants. De même, la pratique de FECR (Fecal Egg Count Reduction) avant et après traitement permet de contrôler l'efficacité de la molécule utilisée, d'évaluer le niveau d'infestation et d'identifier l'espèce ou les espèces parasites infestant l'animal. Cela permet de choisir le bon traitement suivant le type de parasites présent et suivant le niveau d'infestation. En cas d'échec du traitement, cela permet d'en changer et de limiter la sélection de parasites résistants (61,62).

En cas de coliques obstructives dues à un très grand nombre de parasites, l'utilisation d'un anthelminthique peut entraîner des perforations de l'intestin et la mort de l'animal (52). Il est alors conseillé dans un premier temps d'enlever les adultes de l'intestin par une entérotomie puis de traiter les chevaux avec un anthelminthique (48,51,52).

B. Insectes

Les insectes représentent une classe du monde animal comprenant un grand nombre d'espèces très diverses. Si certaines espèces sont considérées comme bénéfiques, notamment les polinisatrices, les auxiliaires de lutte biologique (coccinelles mangeuses de pucerons) ou encore les insectes à fortes valeurs nutritionnelles tels que les scarabées ou les sauterelles, beaucoup sont des espèces parasites impactant la santé humaine et animale ainsi que les végétaux.

Ce projet de thèse s'est intéressé à des insectes aptères cosmopolites parasitant les humains : les poux.

1. Anatomie des insectes

La diversité d'espèces d'insectes s'accompagne d'une grande variété morphologique. Cependant, chaque espèce d'insecte présente des caractéristiques communes. Le corps des insectes est un exosquelette composé majoritairement de chitine et segmenté en plusieurs parties incluant la tête, le thorax et l'abdomen (**Figure 9**).

La tête est composée d'antennes, d'une paire d'yeux composés, d'ocelles et de pièces buccales. Bien que d'organisation simple, ces organes connectés au « cerveau » recueillent les informations sensorielles. Les antennes sont des organes sensoriels composés de différents récepteurs capables de capter de nombreuses informations comme les mouvements, les odeurs (phéromones), les sons ainsi que le taux d'humidité. Chez les insectes, les odeurs sont captées par des récepteurs au niveau des lobes antennaires qui transmettent l'information aux corps champignons qui sont également impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémoire. Les antennes ont également un rôle dans la communication et dans l'analyse de l'environnement grâce à des récepteurs tactiles. Les yeux composés sont formés d'un ensemble de récepteurs sensibles à la lumière appelés des ommatidies. Les ocelles sont des organes captant l'intensité lumineuse et aurait un rôle dans le cycle circadien et aiderait à l'orientation dans l'espace. Les pièces buccales comprennent généralement des mandibules, des maxilles, un labium et un labrum ayant un rôle dans l'alimentation. Chez les insectes suceurs-piqueurs hématophages tels que les poux, le labium est composé de 4 segments dans lesquelles sont retrouvés des stylets correspondant aux maxilles et aux mandibules servant à percer la peau avant le repas sanguin. Le thorax apporte principalement les fonctions de locomotion. C'est au thorax que sont retrouvés les trois paires de pattes caractéristiques des insectes ainsi que les ailes pour certaines espèces. L'abdomen englobe un certain nombre d'organes nécessaires aux fonctions telles que la digestion, la respiration, l'excrétion et la reproduction car c'est à ce segment que sont localisés les organes génitaux (63).

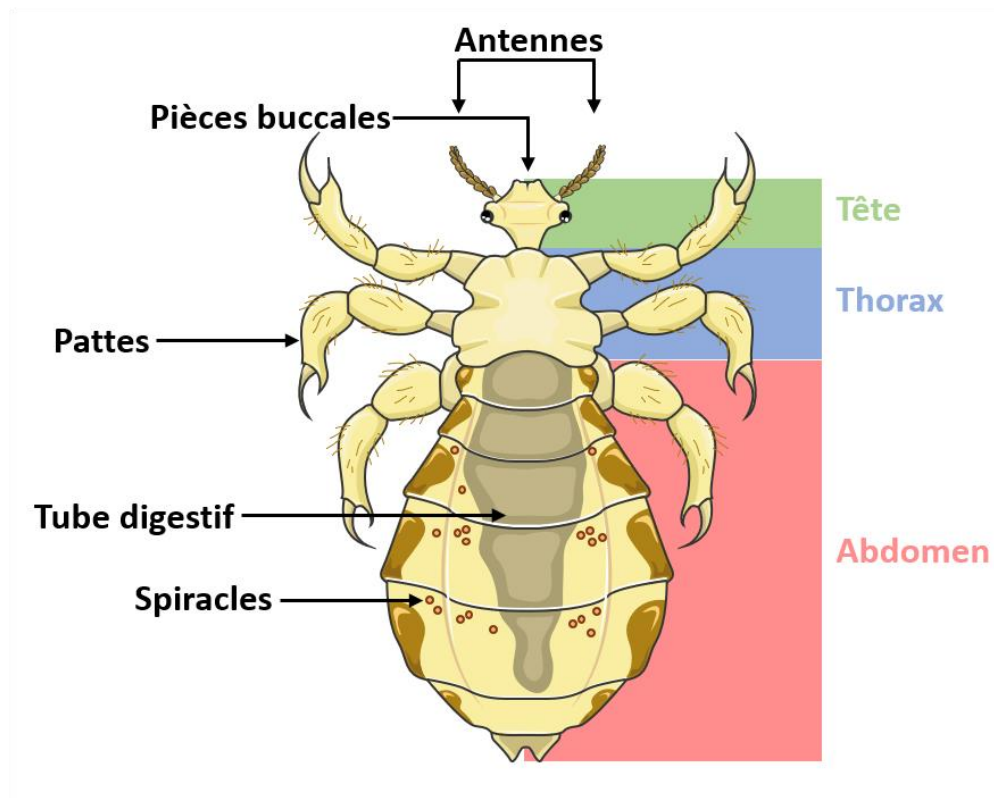


Figure 9 : Schéma de la structure morphologique des insectes en se basant sur la morphologie du pou de corps humain *Pediculus humanus humanus* (adaptée du mémoire de Nancy Jabbour)

Concernant les systèmes internes, les insectes possèdent un système nerveux simple, un système excréteur, un système digestif, un système reproducteur et à l'inverse des nématodes, ils possèdent un système respiratoire et un système circulatoire. Le « cerveau » est un amas de cellules nerveuses localisées dans la tête et est relié au reste du corps (thorax et abdomen) via un cordon nerveux ventral. Ce cordon relie les ganglions nerveux tout le long du corps dont le nombre varie selon l'espèce et le segment. Chaque ganglion sert aux fonctions propres de chaque segment. Chez la drosophile, le « cerveau » est constitué d'un amas de neurones dont les corps cellulaires sont regroupés à la périphérie avec leurs axones et dendrites dirigés vers le centre pour former le neuropile (63).

Le système excréteur participe à l'éjection des déchets azotés et à maintenir la balance osmotique. Le système digestif est composé d'un pharynx et d'un œsophage avec des sacs de stockage et d'absorption de la nourriture suivi des intestins et de l'anus. Les éléments du système reproducteur des insectes sont nommés de la même façon que pour les vertébrés. Chez les mâles, le système reproducteur se compose de testicules reliés à un conduit éjaculatoire par les canaux déférents. Chez les femelles, le système reproducteur est composé d'une paire d'ovaires contenant les œufs, de plusieurs spermathèques stockant le sperme et de glandes sécrétant une large gamme de substances nécessaires à la ponte et à la protection des œufs. Le système respiratoire est composé de sacs de stockage de l'air situés dans l'abdomen ou le thorax. Les sacs sont reliés avec l'extérieur par des trachées dont l'ouverture est contrôlée par des stigmates (appelées spiracles). Le système circulatoire est ouvert, c'est-à-dire que les éléments internes des insectes baignent dans de l'hémolymphe dont le mouvement est assuré par les mouvements de l'animal et par des vaisseaux contractiles dorsaux (63).

2. *Pediculus humanus humanus*

Les poux humains, *Pediculus humanus*, ont une répartition mondiale (64,65) et impactent plusieurs millions de personnes chaque année (66). Bien que personne ne soit épargné, les infestations de poux sont plus courantes chez les enfants (67,68) et les personnes sans domicile (69,70) n'ayant pas accès aux services d'hygiène de base. Aux Etats-Unis, le nombre de personnes nouvellement infestées est estimé à 6 - 12 millions chaque année. Cela représente un coût économique d'un milliard de dollars comprenant le coût des traitements, des visites médicales, des mesures de préventions mises en place notamment dans les écoles et l'absentéisme au travail des parents qui doivent s'occuper de leurs enfants. De plus, les poux de corps sont des vecteurs de maladies humaines qui ont fait des ravages au 20^e siècle (typhus, fièvre des tranchées) (71). Cela confère à *Pediculus humanus* une grande importance médicale, sociale et économique et en font un sérieux problème de santé publique dans les écoles et pour les personnes n'ayant pas accès aux services nécessaires à une bonne hygiène de vie (72).

a. Distribution

Les poux sont des insectes hématophages faisant partie de l'ordre des *Phthiraptera* (sous ordre *Anoplura*). Cet ordre comprend les poux parasitant différentes espèces de mammifères dont chaque espèce de pou est spécifique de son espèce hôte. A la différence d'autres insectes, ils n'ont pas d'ailes mais ont des pinces préhensibles utiles à leur accrochage aux poils (cheveux) ou aux vêtements. Les poux sont composés de trois parties : l'abdomen, le corps et la tête. Le mâle mesurant 3 mm est plus petit que la femelle qui mesure 3,3 mm. En plus de leur taille permettant de différencier leur sexe, les femelles ont l'extrémité de l'abdomen échancrée tandis que celle des mâles est conique (**Figure 10**). Ils sont recouverts d'une couche de chitine protectrice. Les poux possèdent des pièces buccales acérées capables de transpercer la peau de leur hôte qui correspond à leur mode de vie d'ectoparasite hématophage obligatoire (73).

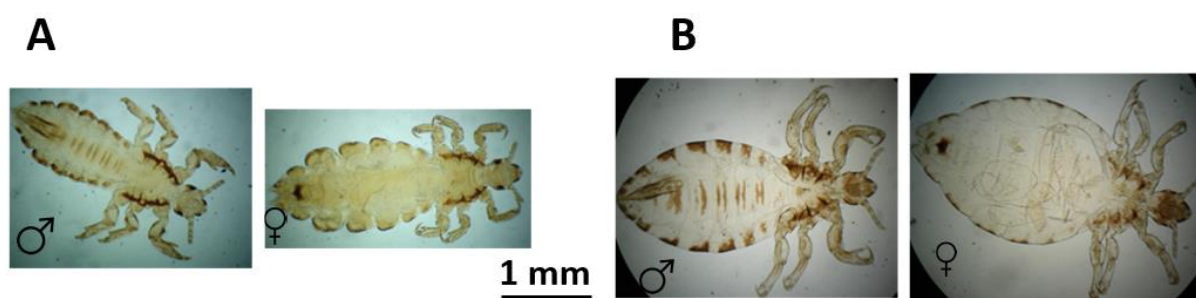


Figure 10: Photographie de poux adultes mâles et femelles en microscopie optique (x40, BioMAP)

- A. Poux de tête *Pediculus humanus capitis*
- B. Poux de corps *Pediculus humanus humanus*

Chez l'Homme, on retrouve deux types de poux avec des modes de vie différents : les poux de tête *Pediculus humanus capitis* vivant sur la tête et les poux de corps *Pediculus humanus humanus* vivant dans les vêtements (73,74). Il est possible que ces deux types de poux appartiennent à la même espèce car leur génotype est quasi-identique avec un seul gène en plus pour les poux de tête. Aussi, les différences d'expression observées de certains gènes entre ces deux sous types se traduiraient par une différence d'écotype et de morphologie (74–76). En effet, les poux de corps sont généralement plus grands, plus clairs et ont des antennes plus grandes que les poux de tête (**Figure 10**). Ils sont en revanche moins chitinisés.

Ces différences morphologiques se traduisent par des différences physiologiques. Les poux de corps stockent plus de sang et peuvent survivre plusieurs jours sans s'alimenter alors que les poux de tête doivent se nourrir plusieurs fois par jour (64). L'une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène est que ces deux sous espèces se seraient différenciées à la suite de fortes infestations. Une infestation massive aurait poussé les poux de tête à migrer dans les vêtements et se seraient adaptés à ce nouveau mode de vie (74).

b. Cycle

Les poux ont un cycle monoxène et se transmettent par contact. Par conséquent, les filles ayant généralement des cheveux plus longs que les garçons sont plus touchées. De même, des contextes de guerre ou de pauvreté (sans abris) favorisent la transmission de poux (surtout des poux de corps) à cause du manque d'accès aux services d'hygiène élémentaires ainsi qu'aux traitements adéquats.

Les poux pondent une dizaine d'œufs, aussi appelés lentes, chaque jour. Les femelles pondent à la racine des cheveux où la température et l'humidité sont idéales. La lente est fixée au cuir chevelu grâce à une sorte de colle produite par la femelle au moment de la ponte. Les poux vivant plusieurs semaines, l'infestation peut s'amplifier rapidement. Après 7 jours, la lente éclot. Le développement de la nymphe passe par des mues successives jusqu'au stade adulte et dure une dizaine de jour (**Figure 11**) (77).

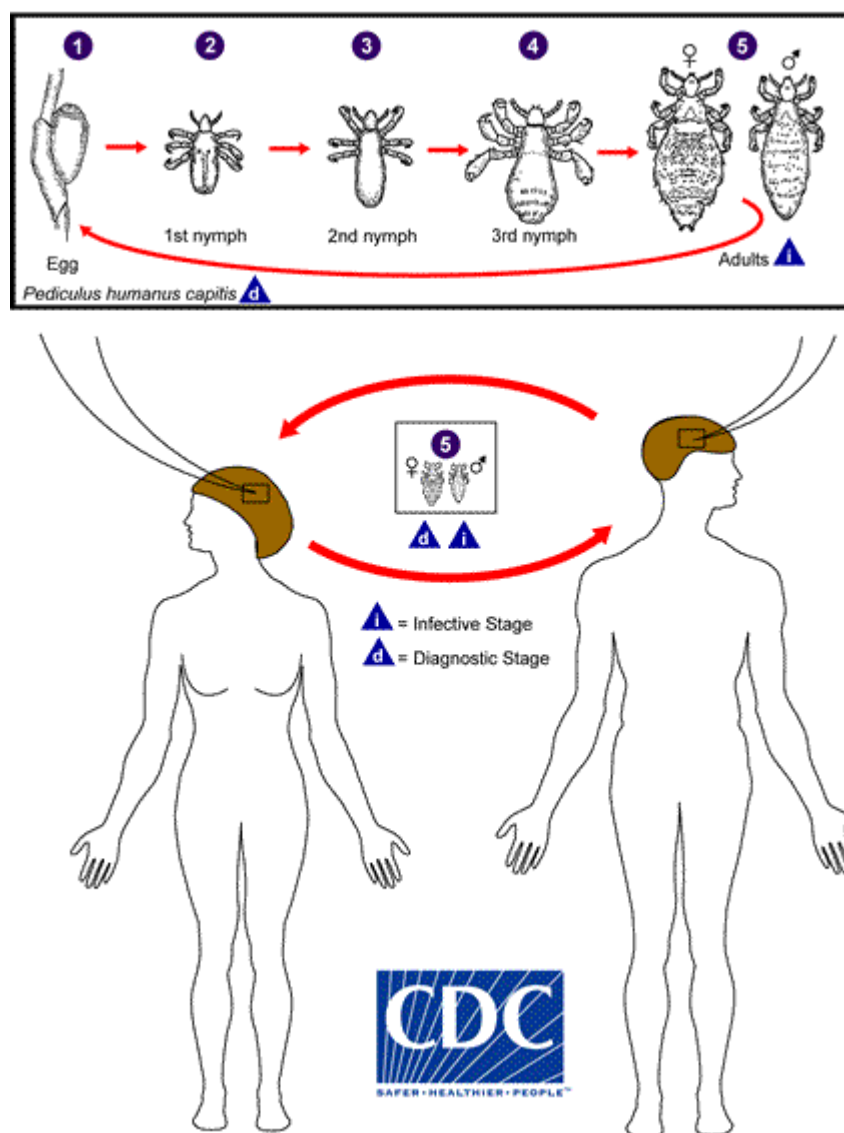


Figure 11: Cycle de développement du pou humain *Pediculus humanus* (d'après le CDC)

c. Pédiculose et maladies associées

Les infestations de poux provoquent des démangeaisons plus ou moins intenses suivant les personnes et le niveau d'infestation. Ces symptômes correspondent à la réponse immunitaire de l'hôte contre les composés présents dans la salive et les fèces des poux. De plus, une perte d'intégrité de la peau peut survenir à la suite de grattages répétés conduisant à des surinfections bactériennes. Cependant, la plupart des infestations sont asymptomatiques (78).

Si les poux ont un fort impact social notamment chez les enfants qui subissent les moqueries de leurs camarades, participant à leur isolation, cet état d'isolement est également accentué pour les sans-abris (78). Ils présentent également un réel danger pour la santé publique. En effet, les poux de corps sont vecteurs de maladies mortelles en absence de traitements comme le typhus exanthématique, la fièvre des tranchées et la fièvre récurrente à poux causés respectivement par les bactéries *Rickettsia prowazekii*, *Bartonella quintana* et *Borrelia recurrentis* (71). De plus, aucun vaccin n'est à ce jour disponible pour ces maladies.

d. Traitements

Le diagnostic d'une pédiculose se fait par observation visuelle d'une lente ou d'un pou. Parmi les traitements physiques, les poux de tête peuvent être éliminés à l'aide d'un peigne à maillage très fin permettant de retirer les lentes et les poux (79). Les poux sont sensibles à de fortes chaleurs. Le seul moyen d'éliminer les poux de corps sans traitement chimique est de laver le linge (vêtements, draps, casquette etc...) à 60°C pendant 30 min, mais cela n'est pas réalisable dans les zones endémiques les plus touchées (zones de guerre, zones sans accès à des services d'hygiène de base...). Cependant aucune de ces mesures ne permet d'atteindre 100 % d'élimination de l'infestation conduisant à des ré-infestations régulières. C'est à la fin de la première guerre mondiale, à la suite d'une épidémie de typhus corrélée à une épidémie de poux de corps que la recherche a permis de développer des traitements chimiques plus efficaces (73,80) (**Tableau 1**). Cependant, le contrôle des infestations de poux reste difficile à cause de l'inefficacité de nombreux traitements mis sur le marché (81).

Pédiculicides	Classe	Mécanisme d'action	Activités Adulticide/ovicide	Effets secondaires	Résistance	Références
Pédiculicides avec un mode d'action physique						
Diméticone	Huiles de silicone synthétiques	Occlusion	Oui/oui	Peu	Non	Durand et al, 2012 Burgess et al, 2013 Feldmeir, 2014
Myristate d'isopropyle	Ester	Occlusion ou dissolution de la cire épicuticulaire	Oui/?	Minime	Non	Feldmeir, 2014
1,2-octanediol	Détergents	Déshydratation en réduisant la capacité à limiter la perte d'eau à travers la cuticule	Oui/non	Minime	Non	Burgess et al, 2013 Feldmeir, 2014 Burgess & Silverston, 2015
Alcool benzyl	Alcool aromatiques	Asphyxie	Oui/non	Minime	Non	Meinking et al, 2010
Pédiculicides avec un mode d'action neurotoxique						
DDT dichlorodiphenyltrichloroethane	Organochloride	Ouvre les canaux sodium dans les neurones	Oui/oui	Toxique	Oui	Durand et al, 2012 Bonilla et al, 2013
Lindane	Organochloride	Inhibe les GABACl	Oui/oui	Toxique	Oui	Durand et al, 2012 Bonilla et al, 2013
Pyréthrine naturelles	Extrait de chrysanthème	Retarde la repolarisation des canaux voltage-dépendant	Oui/non	Mineures	Oui	Bonilla et al, 2013
Perméthrine, pyréthrine synthétiques	(+)-3-phenoxybenzyl 3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2, Diméthyl cyclopropan Carboxylate	Retarde la repolarisation des canaux voltage-dépendant	Oui/non	Mineures	Oui	Durand et al, 2012 Bonilla et al, 2013 Clark et al, 2013
Malathion	Organophosphate	Inhibition irréversible de l'acétylcholine esterase	Oui/non	Mineures	Oui	Durand et al, 2012 Bonilla et al, 2013 Kwon et al, 2014
Carbaryl	Carbamate	Inhibition irréversible de l'acétylcholine esterase	Oui/non	Modéré à très toxique	Oui	Durand et al, 2012 Bonilla et al, 2013
Ivermectine	Lactone macrocyclique	Ouverture irréversible des GluCl	Oui/non	Non à minime	Oui	Chosidow et al, 2010 Clark et al, 2013 Diatta et al, 2016
Spinosade	Spinosynes	Surstimulation des cellules nerveuses en agissant comme l'acétylcholine	Oui/oui	Mineures	No	Aditya & Rattan 2012 Feldmeier, 2014

Tableau 1 : Traitements les plus utilisés contre les infestations de poux avec des indications sur leur mode d'action, leur activité adulticide ou ovicide, la gravité des effets secondaires ainsi que les résistances rapportées (adapté de Amanzougaghene et al, 2020)

Les produits « étouffeurs » à base de silicone (diméticone) sont largement répandus bien que leur efficacité dépendent du respect des consignes d'applications et ont une action limitée contre les lentes en plus d'être inutilisable contre les poux de corps (82–84). Parmi les autres pédiculicides ayant un mode d'action physique, on retrouve le myristate d'isopropyle, le 1,2-octanediol et l'alcool benzylique (85). Parmi les traitements ciblant le système nerveux, les organochlorés (lindane, DDT), les organophosphates (malathion) et les carbamates (carbaryl) ont été beaucoup utilisés et ciblent respectivement les récepteurs au GABA, l'acétylcholine estérase et les canaux sodiques voltage-dépendant. Cependant, l'apparition de poux résistants à ces traitements (77,86–89) ainsi que leurs effets neurotoxiques sur les enfants et leur toxicité sur l'environnement les rendent déconseillés voir interdits d'utilisation suivant les pays (90–95). A ce jour, le CDC et l'Académie Américaine de Pédiatrie (AAP : American Academy of Pediatrics) recommandent d'utiliser en traitement de première intention les molécules de la famille des insecticides pyréthrinoïdes comprenant les pyréthrines et les perméthrines (96,97) qui agissent sur les canaux sodiques voltage-dépendant du poux. De plus, grâce à son activité insecticide (98) et à sa faculté de tuer des poux résistants à d'autres molécules (perméthrines) (99), les lactones macrocycliques (ivermectine) et le spinosade émergent comme traitements alternatifs (100–103). L'ensemble des traitements sont des produits d'application topique tandis que l'ivermectine est la seule molécule pouvant être administrée oralement. Par conséquent, c'est la seule molécule disponible pour traiter les infestations de poux de corps. Malgré son efficacité, des poux de tête et de corps résistants à l'ivermectine ont déjà été observés (104–106) rendant le traitement des infestations plus difficile. Le développement de nouveaux pédiculicides pour lutter contre les poux de corps est urgent.

II. Les lactones macrocycliques : anthelminthiques et insecticides

Plusieurs molécules sont disponibles pour traiter les infestations de nématodes et d'insectes parasites. A ce jour, 7 familles de molécules sont utilisées comme anthelminthiques : les benzimidazoles, les cyclo-octadepsipeptides, les imidazothiazoles, les spiroindoles, les dérivés aminoacétonitriles, les tétrahydropyrimidines et les lactones macrocycliques (MLs). Ces familles de molécules agissent sur des cibles différentes. Les benzimidazoles inhibent la formation des microtubules en se liant à la β -tubuline (107–109) tandis que les autres familles agissent sur le système nerveux du parasite. Les cyclo-octadepsipeptides (emodepside et composé PF1022A) (110) activent le canal potassique SLO-1 (111). Les imidazothiazoles (levamisole et tetramisole), les dérivés aminoacétonitriles (monepantel) et les tétrahydropyrimidines (pyrantel, morantel, oxantel) sont des agonistes tandis que les spiroindoles (derquantel) sont des antagonistes des récepteurs cholinergiques (112–114). Les lactones macrocycliques ont un mode d'action multicibles plus complexe en interagissant notamment avec les P-glycoprotéines et les canaux chlorure glutamate-dépendant (GluCl) (115). De plus, leur action sur les GluCl est triple car elles ont un effet potentialisateur, agoniste et antagoniste dépendant de la concentration utilisée et du temps d'application (116). Ce projet de thèse s'est focalisé sur l'étude du mode d'action des lactones macrocycliques (MLs) sur l'insecte *P. humanus humanus* et les nématodes *B. malayi*, *C. elegans* et *P. univalens*.

A. Découverte

La découverte des lactones macrocycliques s'est faite en 1975 dans les laboratoires de Merck & Co par William C. Campbell et Satoshi Omura qui seront récompensés par le prix Nobel de médecine en 2015 pour leurs travaux ; prix qui sera partagé avec Tu Youyou pour ses découvertes concernant une nouvelle thérapie contre le paludisme (117). Les lactones macrocycliques sont issues de la fermentation de bactéries présentes dans le sol du genre *Streptomyces* dont les premières lactones macrocycliques découvertes étaient les avermectines représentées par l'abamectine. Les autres avermectines telles que l'ivermectine, l'émamectine, l'éprinomectine, la doramectine et la sélamectine sont des dérivés chimiques ou génétiques des premières avermectines. A l'inverse des avermectines qui sont isolées à partir de *S. avermitilis*, les milbémycines ont été isolées à partir de *S. hygroscopicus* (milbémycine oxime) et de *S. cyaneogriseus* (némamectine) (Figure 12). Cependant, avermectines et milbémycines gardent une structure chimique similaire et gardent des sites de liaison similaires sur les GluCl_s (118).

La première utilisation des lactones macrocycliques ne s'est faite qu'au début des années 1980 mais a rencontré un franc succès aussi bien en médecine humaine et vétérinaire qu'en agriculture, grâce à leur efficacité sur un large spectre de parasites (nématodes, insectes et acariens), leur sûreté pour les mammifères et leur facilité d'utilisation. De plus, les lactones macrocycliques sont efficaces contre les parasites résistants aux autres anthelminthiques sur le marché (benzimidazole, pyrantel et levamisole dans le cas des nématodes de bétail) ce qui en fait une molécule de choix pour contrer ces phénomènes de résistance (98,119).

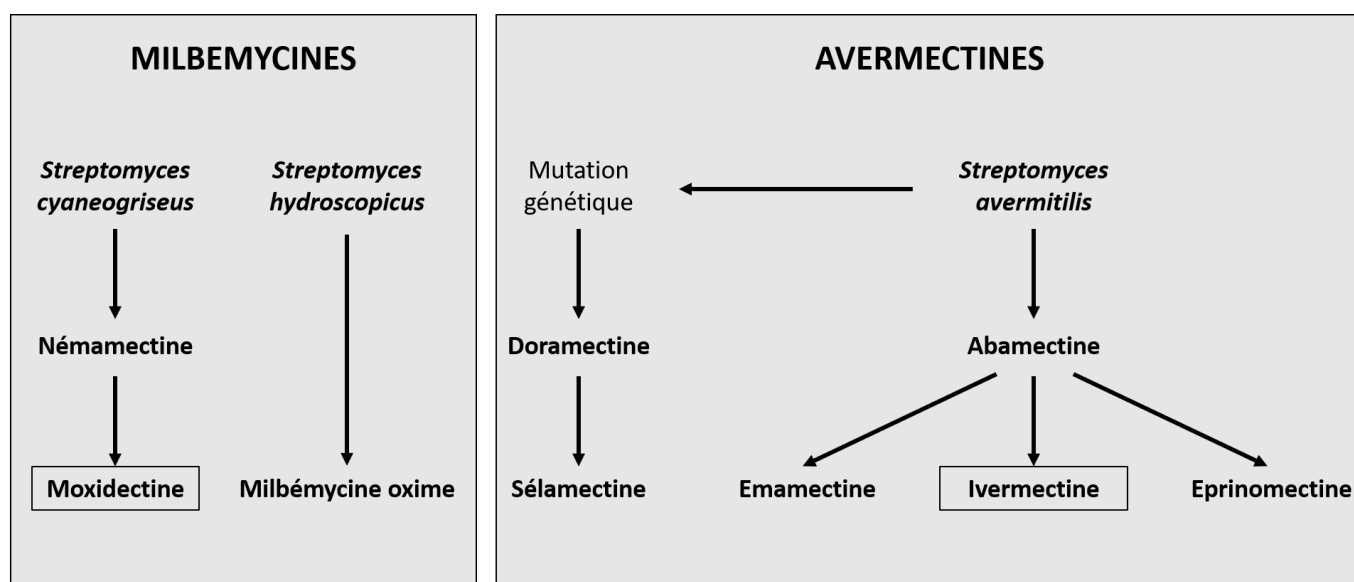


Figure 12 : Représentation schématique de l'affiliation des lactones macrocycliques (adaptée de Prichard et al, 2012 (118))

B. Mode d'action

Les lactones macrocycliques agissent principalement sur les canaux chlorures glutamate dépendant (GluCl_s) et s'y fixent de façon irréversible (120,121). Cela conduit à l'ouverture permanente du canal et à une entrée d'ions chlorures dans la cellule. L'hyperpolarisation membranaire induite par cet influx d'ion est un message inhibiteur conduisant à une paralysie flasque du parasite ou à l'impossibilité de se nourrir (122). Dans une moindre mesure et à des concentrations plus élevées, les MLs agissent également sur les récepteurs au GABA des invertébrés en temps qu'agonistes, potentialisateurs et antagonistes ainsi que sur les nAChRs de vertébrés et d'invertébrés comme modulateurs allostériques négatifs (123). Bien que les lactones macrocycliques n'engendrent que peu voir aucun effet secondaire, une certaine toxicité est rapportée pour certains mammifères et pour l'environnement. En effet, le large spectre d'activité des lactones macrocycliques les font agir sur des organismes non ciblés en première intention dont les plus impactés sont les invertébrés (124). Après avoir été utilisées pour traiter des endo- ou des ectoparasites, les lactones macrocycliques sont retrouvées dans les fèces des animaux (animaux de rente...) ou directement dans l'environnement si elles ont été pulvérisées (aquaculture et agriculture). Cela engendre une certaine toxicité pour la faune du sol (125,126), les insectes coprophages comme les bousiers (127,128), les plantes (129) ainsi que pour la faune aquatique (130). De plus, bien que les lactones macrocycliques ne présentent pas de risques pour la santé de la plupart mammifères, dans certains cas, elles peuvent avoir un effet neurotoxique, notamment l'ivermectine. Pour la plupart des mammifères, des mécanismes de détoxification présents à la barrière hématoencéphalique bloquent l'entrée des lactones macrocycliques dans le système nerveux. Ces mécanismes incluent des pompes d'efflux tels que les P-glycoprotéines appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Dans le cas des chiens de race Scotch Collies, une délétion de 4 pb dans le gène MDR-1 (Multidrug resistance) codant pour une PgP entraîne une sensibilité accrue à l'ivermectine pouvant entraîner la mort non désirée de l'animal (131).

Les lactones macrocycliques sont une famille de molécules massivement utilisées et nécessaires pour lutter contre les parasites mais leur mode d'action reste encore largement méconnu sur un grand nombre d'entre eux. Une meilleure compréhension de leur mode d'action permettra d'adapter les stratégies de lutte et d'utiliser les lactones macrocycliques de façon plus raisonnée et efficace.

C. Structure

En plus de leur origine différente, leur principale différence structurale est la présence de groupes de sucres sur l'atome de carbone C13 des avermectines alors que les milbémécines sont protonnées (**Figure 13**). De plus, bien qu'elles soient très similaires, chaque molécule présente des différences au niveau de leur spectre d'activité, de leur demi-vie, de leurs interactions avec les LGIC des parasites et de leurs interactions avec les système d'efflux des nématodes et des mammifères (118). Ces différences peuvent expliquer la toxicité rencontrées chez certains mammifères (131) ou encore expliquer pourquoi la moxidectine reste efficace pour traiter une souche d'*Haemonchus contortus* (strongle digestif des petits ruminants) résistante à l'ivermectine (132).

Enfin, le caractère lipophile des MLs, leur stabilité et leur utilisation à de très faibles doses (3µg à 2,5 mg/kg) permet de les conditionner de plusieurs façons suivant l'hôte et le parasite à traiter.

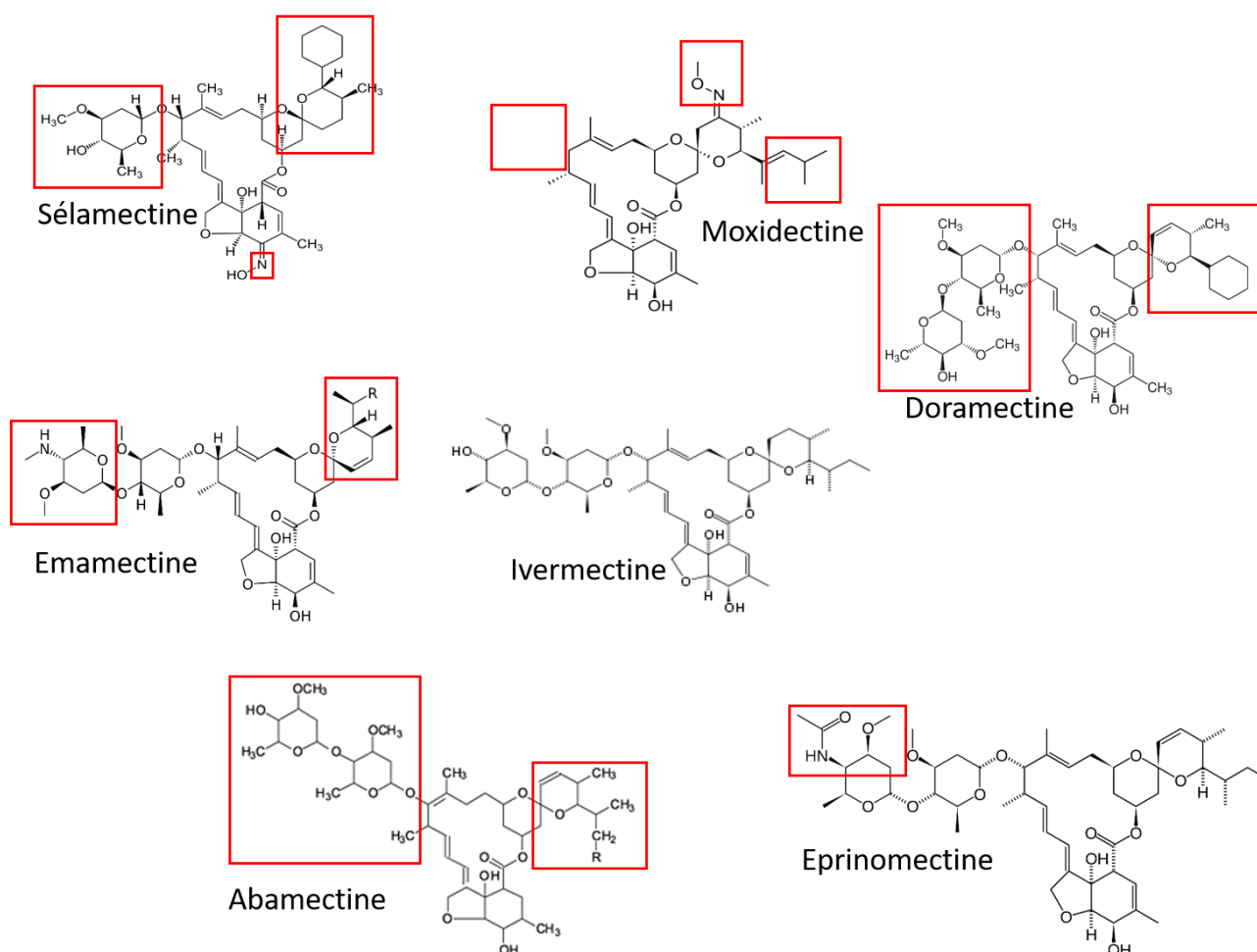


Figure 13 : Structures moléculaires des différentes lactones macrocycliques.

Les différences structurales de chaque molécule par rapport à l'ivermectine sont encadrées en rouge.

D. Formulation et usage thérapeutique

1. Ivermectine

L'ivermectine est la première ML développée et la plus utilisée à travers le monde. Elle est aussi bien utilisée en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire contre les nématodes parasites, les insectes et les acariens ectoparasites (poux, puces...). L'ivermectine est massivement utilisée dans le programme d'éradication de la filariose lymphatique planifié par l'OMS (36) et représente la seule molécule utilisée en prévention de la filariose cardiopulmonaire des chats et des chiens (133). Elle est également utilisée en aquaculture notamment contre les poux de saumon (134). C'est également la molécule la plus utilisée pour traiter les infestations parasitaires des équins à *Parascaris sp* (48).

L'ivermectine est composée des deux molécules dérivées de l'abamectine que sont la 22,23-dihydroavermectine B1a à plus de 90% et de la 22,23-dihydroavermectine B1b à moins de 10%. L'une des différences avec l'abamectine est la présence d'un groupe méthylène en position 26 (117) comme montré dans la **Figure 13**.

L'ivermectine est vendue sous différentes formulations avec différents modes d'administration suivant l'espèce cible. Pour citer quelques exemples possibles, pour l'Homme, l'ivermectine est disponible en prise orale sous forme de tablette pour traiter les nématodes filaires (Mectizan®, Merck Animal Health) ou la gale (Stromectol®, MSD). En médecine vétérinaire, elle est également disponible en tablette à mâcher (Heartgard®, Merial) pour lutter contre les nématodes des chiens, en bain (Ivomec® Drench, Boehringer Ingelheim Animal Health) pour lutter contre les parasites internes et externes des petits ruminants, en injection ou en pour-on pour le bétail (Ivomec® injectable et Ivomec® Pour-on, Boehringer Ingelheim Animal Health) et en pâte à prise orale (Eqvalan®, Boehringer Ingelheim Animal Health) pour les chevaux.

De plus, l'ivermectine peut également être combinée avec d'autres molécules pour des traitements de bi-thérapie telles que le pyrantel (Heartgard Plus®, Merial : disponible contre les filaires du chien).

2. Abamectine

L'abamectine est la première avermectine découverte à partir de laquelle sont dérivées l'ivermectine, l'émamectine et l'éprinomectine (**Figure 12**). Elle est utilisée comme acaricide et insecticide pour protéger les cultures des insectes ravageurs et des parasites acariens (135). Elle est proposée sous forme concentrée émulsifiable avec Vertimec®, Syngenta. L'abamectine est aussi utilisée en combinaison avec le derquantel contre les nématodes parasites des animaux (Startect®, Zoetis).

3. Emamectine

L'émamectine est utilisée en aquaculture pour éliminer les ectoparasites copépodes (crustacés) notamment dans les élevages de saumon. L'émamectine-benzoate est utilisée sous forme de granulés (Slice®, Merck Animal Health) à ingérer par les saumons et présente l'avantage d'être moins toxique que l'ivermectine pour la faune aquatique et l'environnement (136). L'émamectine est également utilisé en agriculture en tant qu'insecticide sous forme de granulés solubles à pulvériser (Proclaim®, Syngenta)

4. Eprinomectine

L'éprinomectine est un dérivé de l'ivermectine B1 appelé 400-épiacétylamino-400-déoxy-ivermectine B1 (**Figure 12**, **Figure 13**). Elle est utilisée en formulation « pour-on » pour traiter les endo- et les ectoparasites des bovins (137) (Eprecis®, CEVA Santé Animale), des ovins et des caprins (Eprinex®, Boehringer Ingelheim Animal Health). Cette molécule est notamment utilisée pour traiter les animaux producteurs de lait car c'est la lactone macrocyclique présentant le moins de résidus dans le lait avec des taux constants (137,138).

5. Doramectine

La doramectine est obtenue par mutation génétique de *Streptomyces avermitilis* (**Figure 12**). Elle est plus proche structurellement de l'abamectine que de l'ivermectine (**Figure 13**). Elle est disponible en solution pour-on ou injectable pour éliminer les endo- et les ectoparasites des bovins, des ovins et des porcins (Dectomax®, Zoetis).

6. Sélamectine

La sélamectine est un dérivé semi-synthétique de la doramectine (**Figure 12**). Elle est efficace contre les filaires du cœur et les puces des chiens et des chats (139) et ne présente pas de risques pour les petits animaux. En effet, la sélamectine est moins toxique que l'ivermectine qui peut être, dans certains cas, létale sur les petits animaux (131). La sélamectine est donc prescrite pour les infestations parasitaires des petits chiens, dont les Scotch Collies. Elle est utilisée pour traiter les ectoparasites ainsi que les nématodes parasites du genre *Toxocaridae* (*Toxocara canis*) et les ankylostomes (*Ancylostoma tubaeforme*) sous forme spot-on (Stronghold®, Zoetis et Selames®, Osalia).

7. Moxidectine

La moxidectine fait partie des mylbémeycines qui ne possèdent pas de groupements de sucres en C13 contrairement aux avermectines. La moxidectine a une meilleure demi-vie que les autres lactones macrocycliques. Elle est donc plus persistante dans l'hôte traité. Cela peut s'expliquer par son affinité moindre pour les PgP par rapport à l'ivermectine (140). Il a été montré que la moxidectine est un meilleur anthelminthique qu'acaricide d'où son utilisation contre les parasites gastro-intestinaux. Cette molécule est la seule lactone macrocyclique ayant une autorisation de mise sur le marché avec l'ivermectine pour traiter les infestations équine à *Parascaris sp.* sous forme de gel oral (Equest®, Zoetis). Elle est également utilisée en forme injectable en sous cutanée pour lutter contre les endo- et les ectoparasites des bovins et des ovins (Cydectine®, Zoetis). La moxidectine est utilisée en combinaison avec le fluralaner (famille des isoxazolines à activité insecticide et acaricide) chez les chats (Bravecto® Plus, Intervet International BV).

E. Résistances aux lactones macrocycliques

Chez les nématodes et les insectes parasites, des résistances sont observées pour de nombreuses familles de molécules y compris celle des lactones macrocycliques. Suite à l'utilisation intensive des MLs comme insecticides et anthelminthiques en médecine humaine, en médecine vétérinaire et en agriculture, couplé au faible nombre de familles de molécules disponibles a irrémédiablement conduit à l'émergence de parasites résistants.

L'émergence d'arthropodes résistants devient problématique aussi bien dans les élevages de bétails, qu'en aquaculture, en agriculture et en médecine humaine. Bien que l'ivermectine n'ait été autorisée que récemment comme traitement des pédiculoses, des résistances de terrain ont déjà été observées chez les poux *Pediculus humanus* avec une potentielle implication des GluCl (104,105) et des PgPs (141,142) dans ces phénomènes de résistance. De même, l'ivermectine massivement utilisée dans les élevages d'animaux de rente a conduit à l'émergence de résistances chez les ectoparasites tels que les tiques (143–145) ou l'acarien des ovins *Psoroptes ovis* (146). Aussi, la lutte contre les ectoparasites du saumon passant par l'utilisation massive d'émamectine a conduit à l'apparition de parasites résistants (147). En agriculture, des mutations sur un GluCl rend les acariens *Tetranychus urticae* et les teignes *Plutella xylostella* résistants à l'ivermectine (148) et à l'abamectine (149). Bien que les lactones macrocycliques ciblent principalement les GluCl, les récepteurs au GABA semblent également impliqués car le knockdown (RNAi) du récepteur au GABA *rdl* du parasite du riz *Chilo suppressalis* diminue sa sensibilité à l'abamectine (150).

Concernant les nématodes, à l'heure actuelle, il n'y a pas encore eu de description de résistance à l'ivermectine chez *B. malayi* ce qui est potentiellement dû à son utilisation en bi- ou trithérapie dans les zones d'endémie. En revanche, des phénomènes de résistance ont été rapportés chez d'autres nématodes parasites filaires tels qu'*Onchocerca volvulus* (151) chez l'Homme ou *Dirofilaria immitis* (152,153) chez les canidés. Dans certains pays, la présence de parasites multirésistants (154) rend la situation très préoccupante (155). C'est le cas pour *H. contortus* dont la caractérisation de souches de terrain multirésistantes aux trois familles d'anthelminthiques les plus couramment utilisés (benzimidazoles, levamisole et ivermectine) rend la situation compliquée et peut mener à terme

à des impasses thérapeutiques (154). Pour *Parascaris sp.*, des phénomènes de résistances et des pertes d'efficacité des lactones macrocycliques sont rapportés dans de nombreux pays à travers le monde tels que dans les pays d'Europe (43,156–161), en Australie (162), au Brésil (163), au Canada (164), aux Etats-Unis (165,166) et en Islande (167). La situation est d'autant plus préoccupante qu'il n'y a seulement que trois familles de molécules disponibles (lactones macrocycliques, benzimidazoles et pyrantel) et que la résistance est également très importante pour les benzimidazoles et le pyrantel (168).

Malgré la mise au point de plusieurs MLs, leurs structures restent très similaires ainsi que leur mode d'action, les rendant susceptible à des phénomènes de résistances croisées (169). Toutefois, bien que la moxidectine ait un mode d'action similaire aux avermectines, ses propriétés pharmacologiques et toxicologiques sont différentes. Par conséquent, la moxidectine peut être une alternative intéressante dans le cas de résistance aux avermectines. En effet, une souche de terrain d'*Haemonchus contortus* résistante à l'ivermectine a pu être traitée avec de la moxidectine (132). Ces résultats illustrent le manque de connaissance sur le mode d'action des différentes lactones macrocycliques comme l'ivermectine ou la moxidectine et suggèrent que les mécanismes impliqués dans la résistance sont complexes et impliquent plusieurs mécanismes.

Les études sur la résistance aux lactones macrocycliques ont montré qu'elle est multifactorielle, bien que les mécanismes moléculaires impliqués restent encore largement méconnus. Les mécanismes potentiels impliquent notamment des mutations dans les cibles pharmacologiques (17,154,170–177), la diminution de leur taux d'expression (154,178) ou leur composition en sous-unités (121,179). Par ailleurs, les systèmes de détoxification de xénobiotiques tels que les PgPs sont également impliqués dans des phénomènes de résistances (180,181). L'apparition de la résistance est favorisée par des traitements intensifs d'une même classe de molécules qui conduit à une forte pression de sélection. L'utilisation de molécules en sous dosage est également un facteur de risque pouvant favoriser la sélection de caractères apportant une tolérance ou une résistance aux traitements (182). Pour les nématodes, en plus de la fréquence de traitement, une récente étude de modélisation a montré que le climat et la période de traitement avaient également un impact sur l'apparition de la résistance à l'ivermectine. Il est montré que des traitements biannuels (notamment en automne) dans des zones à climat froid favorisent moins rapidement l'apparition de résistance que des traitements plus nombreux à différentes périodes de l'année et dans des zones avec des saisons moins marquées (183,184).

III. Isoxazolines

A. Découverte

Les isoxazolines sont une famille de molécules développées pour les lutter contre les infestations d'ectoparasites tels que les poux, les puces (*Ctenophalides felis*, *Ctenophalides canis*) les tiques (*Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*) et les acariens (*Demodex canis*, *Sarcoptes scabiei*). L'afoxolaner fut la première isoxazoline à avoir une autorisation de mise sur le marché en 2013, suivi par le fluralaner en 2014. A ce jour, elles ont un usage strictement vétérinaire (chiens, chats et volailles) mais leur efficacité sur des parasites arthropodes de cultures (lépidoptères, coléoptères) pourrait élargir leur spectre d'utilisation (185,186).

B. Mode d'action

Les isoxazolines ont un mode d'action neurotoxique. En effet, ils agissent sur le système nerveux en inhibant la neurotransmission. Elles sont principalement des antagonistes des canaux chlorure activés par le GABA (GABACl) mais présentent également, dans une moindre mesure, une activité antagoniste sur les GluCl_s. Les isoxazolines présentent une efficacité d'action sur les GABACl_s de l'ordre du nanomolaire. Les isoxazolines ont un mode d'action sélectif sur les insectes et acariens car leur cibles moléculaires (GABACl et GluCl_s) n'ont pas d'homologues chez les mammifères. Par conséquent, peu d'effets secondaires ont été observés chez les mammifères traités (réactions cutanées et troubles digestifs mineurs dans de très rares cas).

Aussi, bien que seul le fluralaner soit autorisé pour le traitement des animaux gestants et allaitant, les isoxazolines ne présentent pas de risques pour ces animaux ou leurs descendance. De même, les animaux porteurs de la mutation MDR-1 -/- (déficience en P-gp), tels que les chiens colleys, peuvent être traités avec des isoxazolines sans risques particuliers (185).

C. Structure

Les isoxazolines sont des composés synthétiques possédant tous un noyau isoxazoline (4,5-dihydro-1,2-oxazole) associé à un groupement trifluorométhyle (**Figure 14**). Plus de 200.000 molécules différentes ont été synthétisées dont 200 ont été testées sur différentes espèces d'insectes parasites d'animaux et de plantes. Le fluralaner et l'afoxolaner sont composés de plusieurs énantiomères tandis que le lotilaner et le sarolaner ne sont composés que d'un seul énantiomère (186).

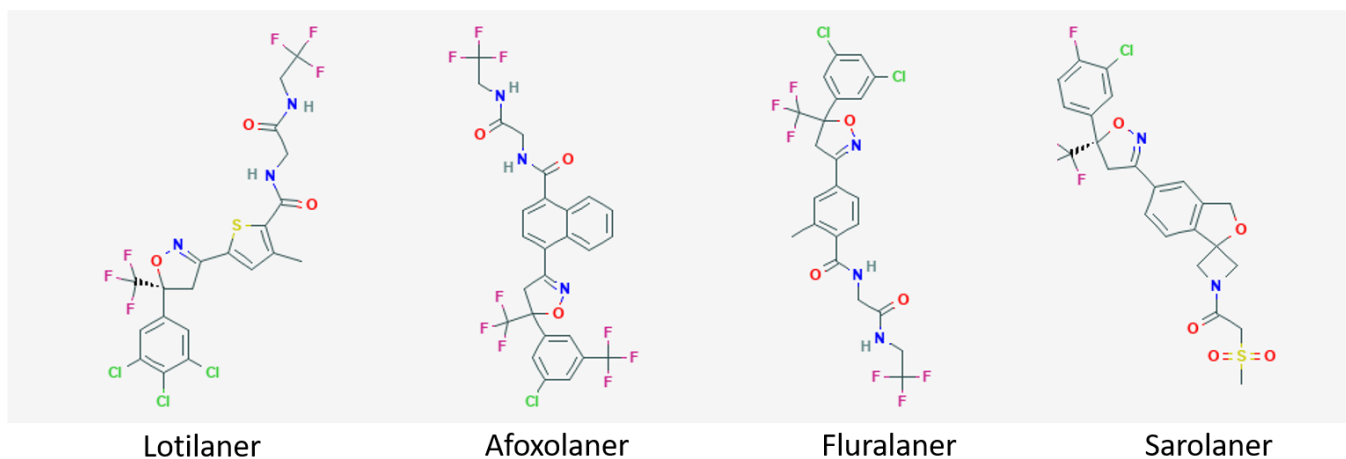


Figure 14 : Structures chimiques des isoxazolines commerciales (lotilaner, afoxolaner, fluralaner et sarolaner)

D. Formulations et usages thérapeutiques

A l'inverse de la plupart des molécules aux propriétés insecticides et acaricides qui sont appliquées de façon topique, les isoxazolines peuvent être administrées oralement ce qui représente une petite révolution dans ce marché. Cela facilite la prise du médicament et réduit l'exposition aux molécules des propriétaires de chiens et de chats. Cependant, les isoxazolines sont également disponibles sous forme de solution à appliquer (185).

1. Lotilaner

Le lotilaner est l'isoxazoline la plus récemment développée (2017). Il est utilisé contre les puces et les tiques des chiens et des chats. La seule formulation disponible est sous forme de comprimés à croquer (Credelio™, Elanco). Avec une seule prise, cette molécule permet une protection contre les infestations d'ectoparasites pendant un mois ce qui est moins que ce que les autres isoxazolines proposent (jusqu'à 12 semaines de protection pour le fluralaner). Il a été montré que le lotilaner active spécifiquement les récepteurs au GABA des arthropodes et pas celui du chien (187).

2. Afoxolaner

L'afoxolaner est utilisé contre les puces, les tiques et les acariens des chiens sous forme de comprimés à croquer (Frontpro, Boehringer Ingelheim) (188,189). Pour les chiens, il est trouvé sous forme de comprimés à croquer en combinaison avec la milbémycine oxime (Nextgard Spectra, Boehringer Ingelheim) (190). Pour les chats, il est également sous forme de solution spot-on en combinaison avec l'éprinomectine et le praziquantel (Nextgard Combo, Boehringer Ingelheim) pour lutter contre les infestations d'ectoparasites et de nématodes.

3. Fluralaner

Le fluralaner est utilisé contre les puces, les tiques et les acariens des chiens et des chats ainsi que contre les poux rouges des volailles. Il est disponible en formulation orale (comprimés à croquer), ou en spot-on (Bravecto, Intervet International) pour les chiens alors que seule la solution spot-on est disponible pour les chats (191,192).

Il peut être utilisé en combinaison avec la moxidectine en solution spot-on pour les chats (Bravecto Plus, Intervet International) (193).

Pour les volailles, le fluralaner est en solution pour administration dans l'eau de boisson (Exzolt, Intervet International). A ce jour, le fluralaner est la seule isoxazoline autorisée pour traiter les animaux gestants et allaitants, y compris pour les poules pondeuses. De plus, il n'y a pas de délai entre le traitement et la récolte des œufs (194).

4. Sarolaner

Le sarolaner est utilisé contre les puces, les tiques et les acariens des chiens sous forme de comprimés à croquer (Mipet Easecto, Zoetis).

Le sarolaner est également utilisé en combinaison avec de la moxidectine et du pyrantel emboate sous forme de comprimés à croquer pour lutter contre les endo- et les ecto-parasites des chiens (Simparica Trio™, Zoetis) (195,196). Pour les chats, le sarolaner est utilisé en combinaison avec de la sélamectine en solution spot-on (Stronghold Plus et Felisecto Plus, Zoetis) (197).

E. Resistances

Les isoxazolines sont une famille de molécules relativement récente dont les premières molécules ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2013 et 2014 pour l'afoxolaner et le fluralaner. A ce jour, aucun phénomène de résistance n'a été décrit contre cette famille de molécules.

Cependant, les isoxazolines ciblent les canaux chlorures des insectes et des acariens qui sont les cibles pharmacologiques majeures d'autres molécules thérapeutiques (MLs, dieldrine, fipronil etc...). Des mutations de résistances sur ces cibles ont été observées chez plusieurs espèces d'insectes. Par conséquent, il est probable que de nouvelles mutations de résistances émergent à force d'utilisation des isoxazolines.

Il est intéressant de noter que les isoxazolines sont une famille de molécules ciblant une région différente des GABACls par rapport à d'autres insecticides. Il a été montré que le fluralaner et le lotilaner gardaient leurs propriétés d'antagonistes sur le récepteurs au GABA RDL possédant des mutations de résistance à la dieldrine et/ou au fipronil chez *M. domestica* (198) et *D. melanogaster* (187). Cette conservation d'efficacité du fluralaner a été confirmée *in vivo* sur des souches de *M. domestica* possédant ces mutations de résistance à la dieldrin et au fipronil (198). De même, le lotilaner garde ses propriétés antagonistes sur le récepteur RDL de *D. melanogaster* possédant des mutations de résistances à la dieldrine et au fipronil (187). Ainsi, les isoxazolines ne seraient pas sujettes à des phénomènes de cross-résistance avec les autres insecticides.

IV. Cibles pharmacologiques majeures des invertébrés : les ligand-gated ion channels

Les ligand-gated ion channels (LGICs) sont les cibles pharmacologiques de nombreuses molécules thérapeutiques allant des anesthésiants (199) aux anxiolytiques utilisés en médecine humaine en passant par les lactones macrocycliques utilisées contre les endo- et les ectoparasites impactant les médecines humaine et vétérinaire (2). Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques importants autant chez les vertébrés que chez les invertébrés. En plus d'être des cibles d'antiparasitaires (200), ils sont également ciblés par des molécules thérapeutiques utilisées contre des pathologies telles que l'anxiété ou la dépression (201). Les LGICs sont divisés en plusieurs superfamilles dont les récepteurs à cys-loop qui possèdent une boucle de deux cystéines reliées par un pont dissulfure dans la région extracellulaire N-terminale de la sous-unité. Dans la séquence protéique, les cystéines sont séparées par 13 acides aminés. Cette boucle est impliquée dans le site de liaison des ligands naturels. Les récepteurs à cys-loop peuvent être activés par l'acétylcholine (récepteurs nicotiques à l'acétylcholine : nAChR), la sérotonine (récepteurs 5-hydroxytryptamine), le GABA (récepteurs ionotropes à l'acide γ -aminobutyrique : GABA-A), la glycine (récepteurs glycine) et le glutamate (canaux chlorure glutamate dépendant : GluCl). L'acétylcholine, la glycine, le GABA et le glutamate sont d'important neurotransmetteurs du système nerveux. Chez les vertébrés et les invertébrés, le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux tandis que l'acétylcholine et le glutamate sont des neurotransmetteurs excitateurs activant la contraction musculaire et libérant certaines hormones. En revanche, chez les invertébrés, le glutamate est également un neuromédiateur inhibiteur lorsqu'il active les GluCl.

A. Structure des LGICs

Grâce à la cristallographie des récepteurs et à leur observation au microscope électronique, certains récepteurs tels que les nAChRs (202,203) ou les GluCl (204) montrent des similarités de structures. Un récepteur LGIC est composé de l'association de cinq sous-unités organisées en pentamère. Cinq sous-unités identiques peuvent s'associer pour former des récepteurs homopentamériques mais différentes sous-unités peuvent également s'associer pour former des récepteurs hétéropentamériques. Une telle diversité de sous-unités et d'associations potentielles supposent également une grande diversité de fonctions.

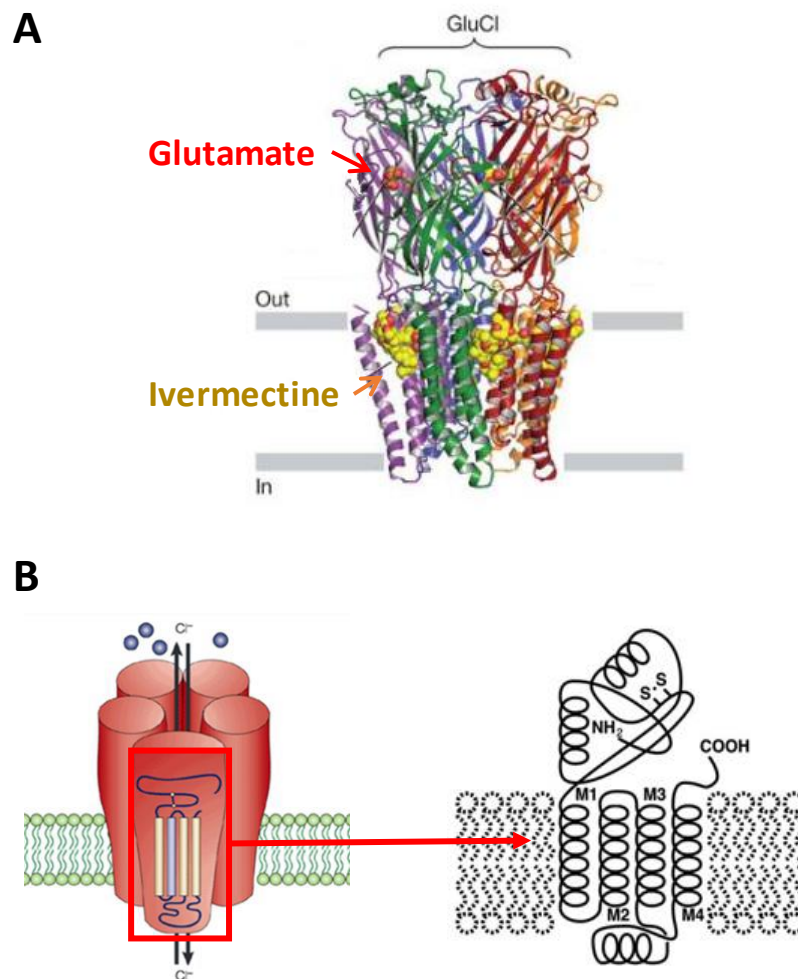


Figure 15 : Structure d'un Ligand-Gated Ion Channel.

A. Cristallographie du récepteur GLC-1 de *C. elegans*. Chacune des cinq sous-unités est différenciée par une couleur (violet, vert, rouge, orange et bleu). Le glutamate représenté par des boules rouges se fixe au niveau de la partie extracellulaire du récepteur. L'ivermectine représentée par des boules jaunes est enchâssée dans la membrane (adaptée de Hibbs & Gouaux, 2011 (**204**)).

B. Structure schématique d'un récepteur et d'une sous-unité. Chaque sous-unité est composée de 4 domaines transmembranaires (M1-4) et d'une boucle cys-loop représentée par un pont disulfure en N-ter (adaptées de Raymond et Sattelle, 2002 et Beech et al, 2011 (**200,205**))

Chaque sous-unité est enchâssée dans la membrane cellulaire grâce à ses quatre domaines transmembranaires (TM1-4) hydrophobes. Une sous-unité a une extrémité N-terminale extracellulaire contenant un domaine cys-loop de treize résidus encadrés par deux cystéines liées de façon covalente. Cette boucle à cystéines est située entre le site de liaison du ligand naturel (acétylcholine, GABA, glutamate...) et le pore du canal (**Figure 15A, Figure 16, Figure 17**). La partie extracellulaire possède également 7 boucles notées d'A à G. La partie C-terminale intracellulaire ainsi que la boucle intracellulaire entre les TM3 et TM4 possèdent des sites de régulation de l'activité du canal (sites de phosphorylation). Le 2^e domaine transmembranaire constitue le pore du canal (**Figure 15B, Figure 16, Figure 17**). Ainsi, le TM2 est responsable de la sélectivité ionique du canal. Un récepteur est un système dynamique qui change de conformation pour passer dans plusieurs états tels que les états ouverts, fermés, désensibilisés, inactif...

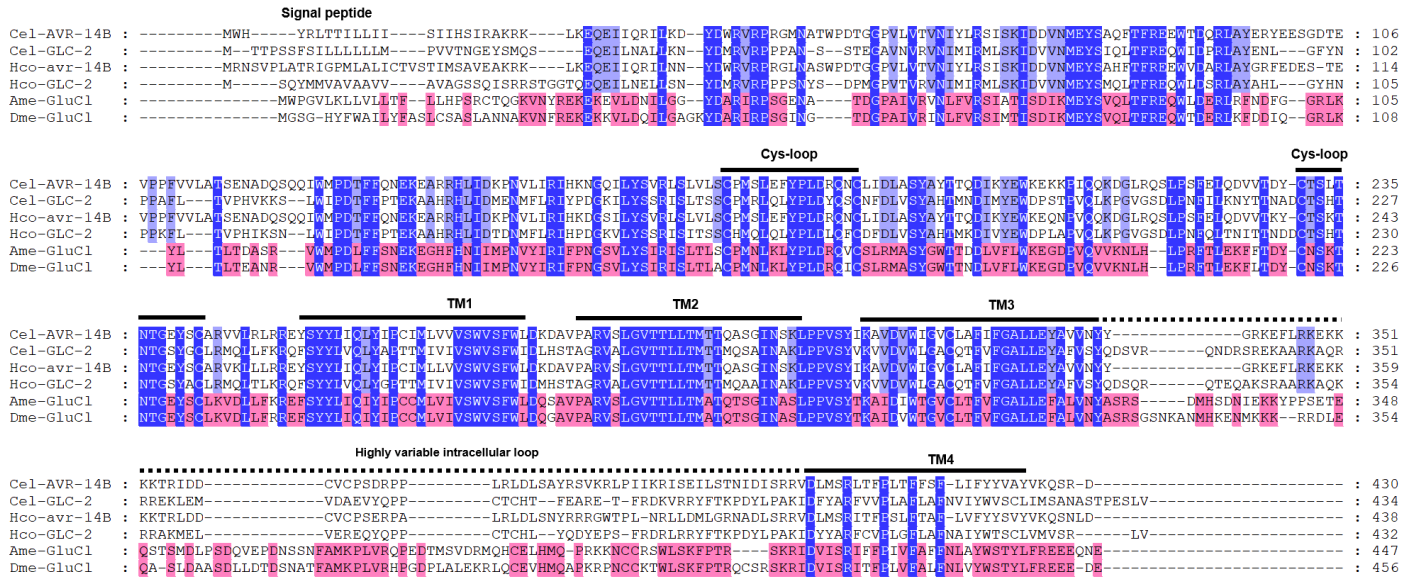


Figure 16 : Alignement de séquences protéiques de GluCl1 des nématodes *C. elegans* (Cel) et *H. contortus* (Hco) et des insectes *A. mellifera* (Ame) et *D. melanogaster* (Dme).

Les domaines transmembranaires, les domaines cys-loop et la partie intracellulaire hypervariable sont indiqués par des barres noires au dessus des séquences. Les acides aminés communs entre toutes les séquences sont surlignés en bleu foncés. Les acides aminés communs entre les GluCl1 de nématodes sont surlignés en bleu clair tandis que les acides aminés communs entre les GluCl1 d'insectes sont surlignés en rose.

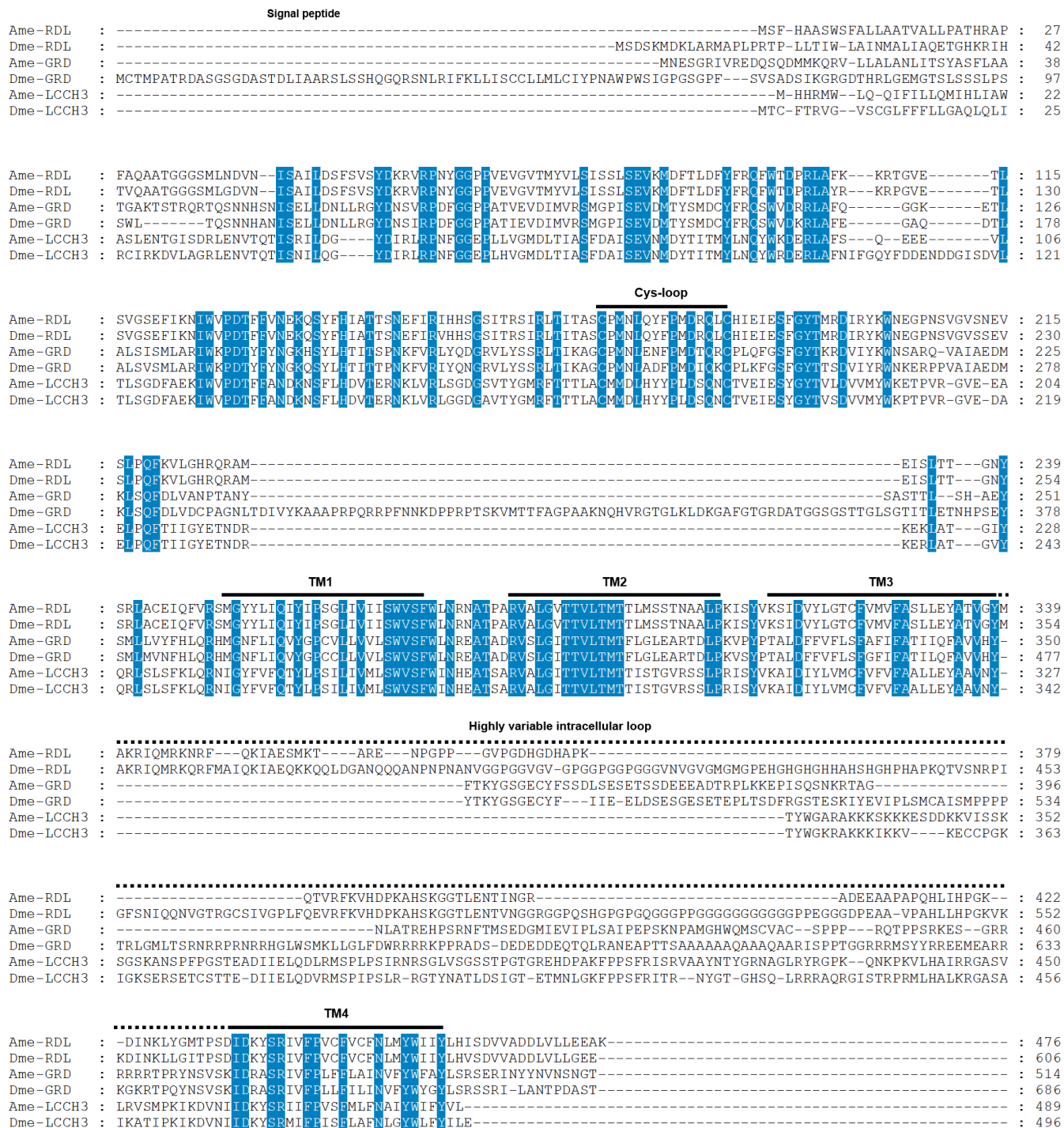


Figure 17 : Alignement de séquences protéiques de GABACl des insectes *A. mellifera* (Ame) et *D. melanogaster* (Dme).
 Les domaines transmembranaires, le domaine cys-loop et la partie intracellulaire hypervariable sont indiqués par des barres noires au dessus des séquences. Les acides aminés communs entre toutes les séquences sont surlignés en bleu foncés.

B. Activation des LGICs

Les LGICs sont présents au niveau post-synaptique à l'interface neurone – neurone ou à la jonction neuromusculaire. A la suite d'un influx nerveux, les ligands naturels sont libérés dans la fente synaptique et se fixent sur les récepteurs présents sur le neurone post-synaptique pour les activer et ouvrir les canaux. Un influx ou un efflux d'ions passe à travers le canal et induit un signal qui peut être impliqué dans certains processus biologiques tels que la contraction musculaire, la ponte des œufs, la recherche de nourriture etc... Dans le cas des GluCl_s et des GABA_{Cl}, l'ouverture du canal permet une entrée d'ions chlore Cl⁻ dans la cellule et entraîne une hyperpolarisation membranaire qui est un signal inhibiteur (204). A l'inverse, les canaux cationiques, comme les nAChRs, vont permettre de transmettre un signal d'excitation. Une fois le signal transmis, les ligands naturels sont dégradés ou recapturés en partie par le neurone présynaptique (**Figure 18**).

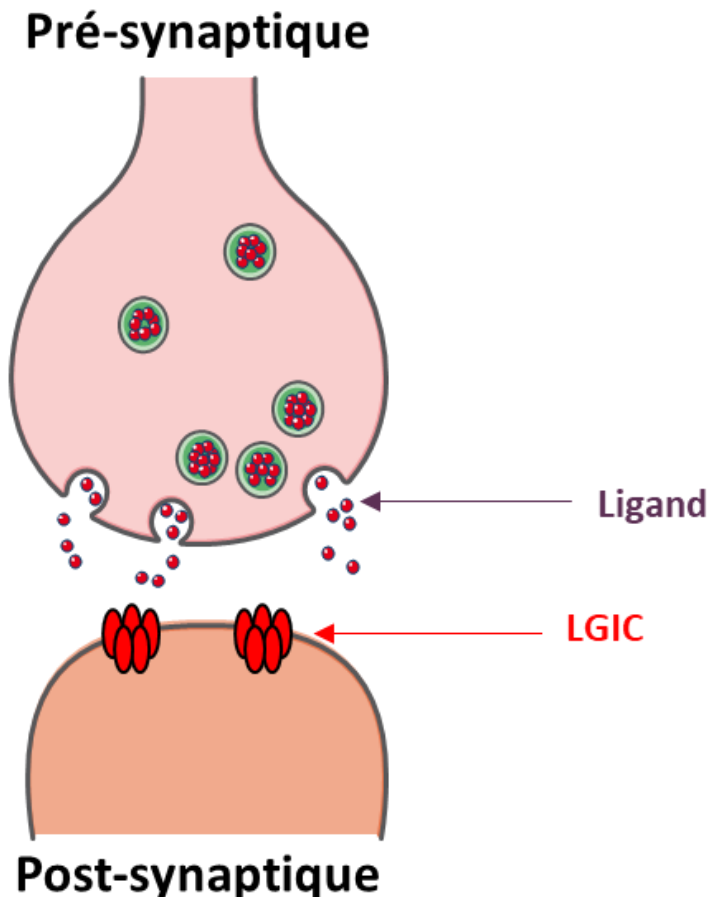


Figure 18 : Structure schématique d'une synapse. Les ligands représentés par des boules violettes sont libérés de la synapse présynaptique à la suite d'un signal nerveux. Les ligands se fixent sur les récepteurs LGICs présents au niveau post synaptique. Suivant le type de récepteur, leur activation induit un signal activateur (nAChR...) ou inhibiteur (GluCl, GABA_{Cl}).

Les lactones macrocycliques se fixent sur certains de ces récepteurs tels que les GluCl_s et les GABA_{Cl}s au niveau de leurs TM1 et TM3 et changent la conformation des récepteurs pour agir sur le TM2 qui est le pore du canal. La fixation des lactones macrocycliques sur les GluCl_s est irréversible (121,206). En effet, l'ivermectine est enchâssée dans la membrane cellulaire (**Figure 15A**) ce qui limite son élimination contrairement aux ligands naturels qui sont rapidement dégradés et recapturés. Ainsi, la fixation des lactones macrocycliques sur les canaux entraînent une ouverture permanente des canaux et envoient un signal inhibiteur permanent inhibant la transmission neuronale ou musculaire (207–209). Physiologiquement, cela se traduit par une paralysie flasque et la mort du parasite (17).

C. Voltage-clamp à deux électrodes pour l'étude des canaux ioniques

L'étude des canaux ioniques est un domaine complexe par le nombre de facteurs pouvant modifier la fonctionnalité et la pharmacologie de ces récepteurs. L'injection d'ARNm codant pour des sous-unités de canaux ioniques dans des ovocytes de *Xenopus laevis* couplés à la technique de voltage-clamp à double électrodes (TEVC : Two-Electrode Voltage-Clamp), a permis d'identifier et de caractériser plusieurs LGICs de vertébrés et d'invertébrés au niveau fonctionnel et pharmacologique. C'est un outil puissant permettant d'identifier la bonne composition en sous-unités pour permettre la formation d'un récepteur fonctionnel et pour caractériser les propriétés pharmacologiques de ces récepteurs.

Les canaux ioniques ligands dépendant servent à transmettre des signaux rapidement à travers l'organisme. Les processus d'activations et de désactivations de ces récepteurs sont finement régulés dont certains agissent sur leur fonctionnalité et leur pharmacologie.

La fonctionnalité et la pharmacologie des récepteurs peuvent être modifiées avec un changement de composition en sous-unité. En effet, l'ajout ou la suppression d'une sous-unité peut complètement changer la pharmacologie d'un récepteur comme cela a été montré pour des nAChR en œufs de xénope (210). Physiologiquement, cela peut se traduire par des fonctions différentes comme c'est le cas pour des GluCl_s d'insectes (211). De même, la formation de certains récepteurs nécessite la présence de protéines auxiliaires qui ne font pas directement partie des récepteurs mais qui permettent leur bonne prise en charge pour l'adressage au réticulum endoplasmique ou à la membrane. C'est le cas de certains nAChR tels que les récepteurs au levamisole ou au morantel (113,210,212). Bien que les GluCl_s et les GABA_{Cl}s décrits ne nécessitent pas leur utilisation, il est possible que des protéines accessoires soient nécessaires pour certains récepteurs ou certaines sous-unités, tandis que d'autres pourraient augmenter le taux d'expression des sous-unités à la membrane. Cela expliquerait pourquoi l'injection de sous-unités seules telles que AVR-14A, GLC-4 ou UNC-49A chez les nématodes ne permet pas de former des récepteurs fonctionnels (17,213). De plus, dans le cas de co-injection d'ARNm, la modification du ratio d'ARNm injectés peut favoriser la formation d'un sous-type de récepteur et ainsi modifier sa pharmacologie comme c'est le cas pour les récepteurs au GABA $\alpha 4\beta 2\delta$ (214).

L'expression de sous-unités à la membrane est également régulée aux niveaux épigénétique, transcriptionnel, traductionnel etc... ce qui au final, conduit à la formation de différents sous types de récepteurs dans des endroits très localisés dans les organismes, avec des fonctions physiologiques et des propriétés pharmacologiques distinctes (215,211). Aussi, la présence de mutations sur une sous-unité peut changer sa fonctionnalité et/ou sa pharmacologie.

D. Glutamate-gated chloride-channels (GluCls)

Les GluCls ne sont présents que chez les invertébrés. Leurs plus proches homologues chez les vertébrés sont les récepteurs à la glycine qui possèdent une deuxième cys-loop caractéristique dans la boucle C en plus de la cys-loop retrouvée chez tous les LGICs (204). Bien que la plupart des insectes ne possèdent qu'un seul gène codant une sous-unité de GluCl, des phénomènes d'épissages alternatifs et d'édition de transcrits engendrent une grande diversité d'isoformes (216–221). Pour les nématodes, le nombre de gène codant des GluCls varie suivant l'espèce (115), allant de 4 gènes pour les filaires (*B. malayi*) à 6 gènes pour *C. elegans* et *H. contortus* (**Figure 19**). L'œuf de la grenouille africaine *Xenopus laevis* a largement été utilisé comme système d'expression hétérologue pour l'identification et la caractérisation fonctionnelle des LGICs de vertébrés et d'invertébrés. C'est un modèle puissant permettant d'étudier la fonctionnalité et la pharmacologie de canaux ioniques (222).

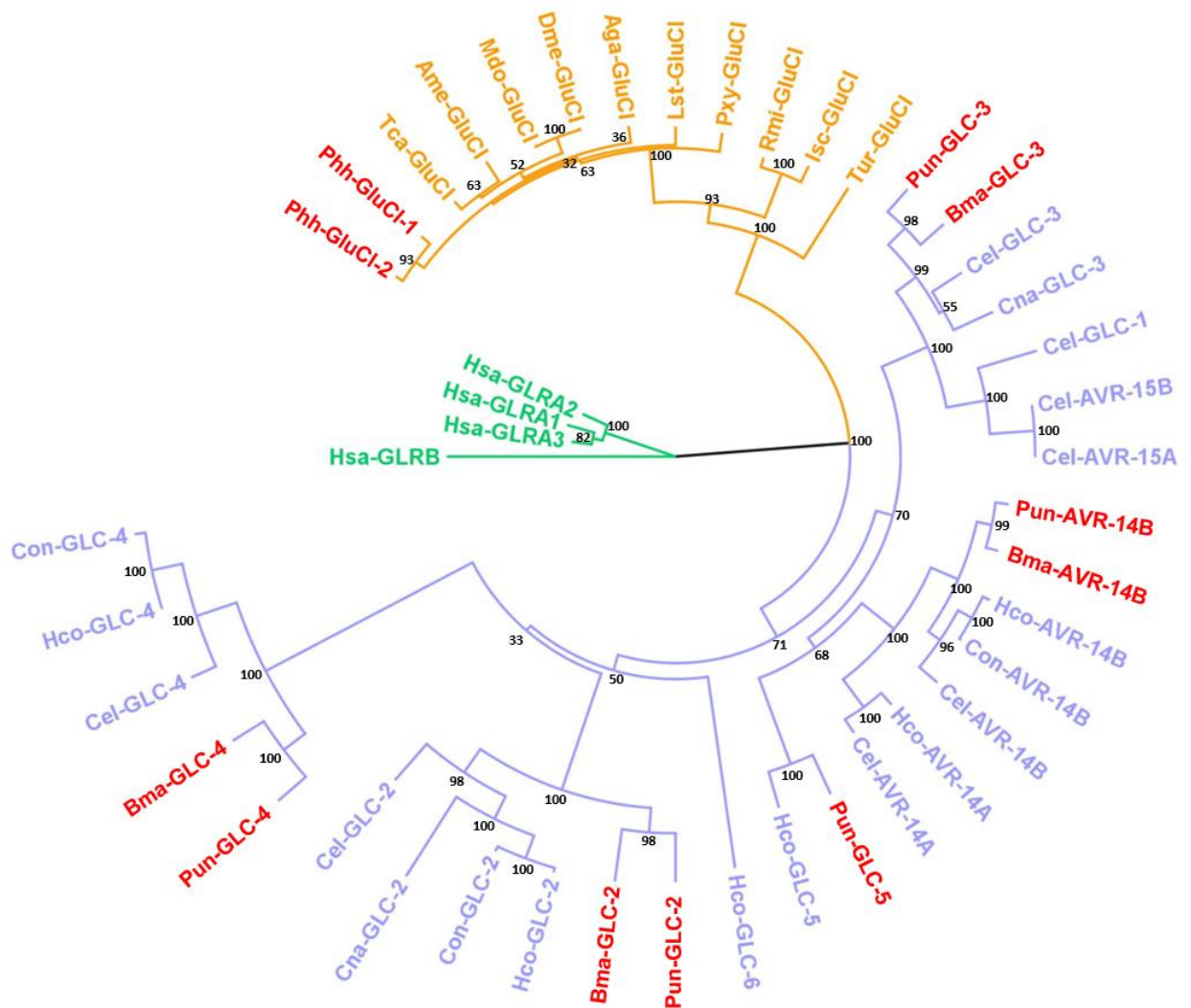


Figure 19 : Arbre de distance (Neighbour Joining) des séquences protéiques des GluCl de nématodes et d'insectes avec les récepteurs à la glycine de vertébrés.

Les séquences utilisées sont disponibles sur Genbank sous les numéros d'accèsion suivant : *Anopheles gambiae* (Aga), Aga-GluCl (AGS43089.1), *Apis mellifera* (Ame), Ame-GluCl (ABG75737), *Brugia malayi* (Bma), Bma-AVR-14B (MW196269), Bma-GLC-2 (MW196266), Bma-GLC-3 (MW196267), Bma-GLC-4 (MW196268), *Caenorhabditis elegans* (Cel), Cel-AVR-14A (AAC25481), Cel-AVR-14B (MW196270), Cel-AVR-15A (CAA04171), Cel-AVR-15B (CAA04170), Cel-GLC-1 (AAA50785), Cel-GLC-2 (AAA50786), Cel-GLC-3 (CAB51708), Cel-GLC-4 (NP_495489.2), *Cooperia oncophora* (Con), Con-AVR-14B (CBM40945.1), Con-GLC-2 (AAR21856.1), Con-GLC-4 (CCN97894.1), *Cylocyclus nassatus* (Cna), Cna-GLC-2 (AAU95604.1), Cna-GLC-3 (AAU95605.1), *Drosophila melanogaster* (Dme) : Dme-GluCl (AAC47266), *Haemonchus contortus* (Hco), Hco-AVR-14A (CAA74622), Hco-AVR-14B (CAA74623), Hco-GLC-2 (CAA70929), Hco-GLC-4 (ABV68894), Hco-GLC-5 (AAD13405), *Ixodes scapularis* (Isc) : Isc-GluCl (ALF36853), *Laodelphax striatellus* (Lst), Lst-GluCl (AEE39458.1), *Musca domestica* (Mdo) : Mdo-GluCl (BAD16657), *Parascaris univalens* (Pun), Pun-AVR-14B (MW187941), Pun-GLC-2 (MW187938), Pun-GLC-3 (MW187939), Pun-GLC-4 (MW187940), Pun-GLC-5 (QZ81966), *Pediculus humanus humanus* (Phh) : Phh-GluCl-1 (MT321070), Phh-GluCl-2 (MT321071), *Plutella xylostella* (Pxy), Pxy-GluCl (NP_001292447.1), *Rhipicephalus microplus* (Rmi) : Rmi-GluCl (AHE41097), *Tetranychus urticae* (Tur) : Tur-GluCl (BAJ41378), *Tribolium castaneum* (Tca) : Tca-GluCl (NP_001107775) et les récepteurs à la glycine de vertébrés sont utilisés comme outgroup, *Homo sapiens* (Hsa), Hsa-GLRA1 (NP_000162.2), Hsa-GLRA2 (NP_001112357.1), Hsa-GLRA3 (NP_001036008.1), Hsa-GLRB (NP_000815.1). Les valeurs de bootstraps (1000 répliquats) sont indiquées à chaque nœud. Les séquences en rouges sont celles identifiées au cours de cette thèse.

1. GluClS de nématodes

a. Récepteurs décrits

A ce jour, huit gènes codant pour des GluClS ont été identifiés et nommés *avr-14*, *avr-15*, *glc-1*, *glc-2*, *glc-3*, *glc-4*, *glc-5* et *glc-6*. Les gènes *avr-15* et *glc-1* n'ont été identifiés que chez le nématode libre *C. elegans* tandis que *glc-5* et *glc-6* n'ont été décrits que chez *H. contortus*. La nomenclature ayant évolué au cours du temps et des recherches, le

Nématode	Gène	Sous-unités	N°accession ARNm	N°accession protéine
<i>C. elegans</i>	<i>avr-14</i>	AVR-14a/GRB2a/GluCl α 3a	Y18347.1	CAA77131.1
		AVR-14b/GBR2b/GluCl α 3b	U41113.1	AAC25482.1
	<i>avr-15</i>	AVR-15a / GluCl α 2a	AJ000538.1	CAA04171.1
		AVR-15b / GluCl α 2b	AJ000537.1	CAA04170.1
	<i>glc-1</i>	GLC-1 / GluCl α 1	U14524.1	AAA50785.1
	<i>glc-2</i>	GLC-2 / GluCl β / GluCl α 2	U14525.1	AAA50786.1
	<i>glc-3</i>	GLC-3 / GluCl α 4	AJ243914.1	CAB51708.1
	<i>glc-4</i>	GLC-4b	NM_063088.5	NP_495489.2
<i>C. Oncophora</i>	<i>avr-14</i>	AVR-14a/GluCl α 3a	FN869115.1	CBM40945.1
		AVR-14b/GluCl α 3b	AY372756.1	AAR21855.1
	<i>glc-2</i>	GLC-2	AY372757.1	AAR21856.1
<i>H. contortus</i>	<i>avr-14</i>	AVR-14a/GBR2a/GluCl α 3a	Y14233.2	CAA74622.2
		AVR-14b/GBR2b/Glu α 3b	Y14234.1	CAA74623.1
		AVR-14c	JF309448.1	ADZ96468.1
	<i>glc-2</i>	GLC-2/GluCl1 β /HG4	Y09796.1	CAA70929.1
	<i>glc-3</i>	GLC-3	JF298242.1	ADZ57171.1
	<i>glc-4</i>	GLC-4	EU006788.1	ABV68894.1
	<i>glc-5</i>	GLC-5	AF076682.1	AAD13405.1
	<i>glc-6</i>	GLC-6	U006789.1	ABV68895.1

Tableau 2 regroupe les différents noms donnés pour chaque sous-unités décrites chez *C. elegans*, *C. oncophora* et *H. contortus*. De même le **Tableau 3** résume les connaissances pharmacologiques des différents sous-types de GluClS décrits chez les nématodes *C. elegans*, *C. oncophora*, *Dirofilaria immitis* et *H. contortus*.

Nématode	Gène	Sous-unités	N°accession ARNm	N°accession protéine
<i>C. elegans</i>	<i>avr-14</i>	AVR-14a/GRB2a/GluCl α 3a	Y18347.1	CAA77131.1
		AVR-14b/GBR2b/GluCl α 3b	U41113.1	AAC25482.1
	<i>avr-15</i>	AVR-15a / GluCl α 2a	AJ000538.1	CAA04171.1
		AVR-15b / GluCl α 2b	AJ000537.1	CAA04170.1
	<i>glc-1</i>	GLC-1 / GluCl α 1	U14524.1	AAA50785.1
	<i>glc-2</i>	GLC-2 / GluCl β / GluCl α 2	U14525.1	AAA50786.1
	<i>glc-3</i>	GLC-3 / GluCl α 4	AJ243914.1	CAB51708.1
	<i>glc-4</i>	GLC-4b	NM_063088.5	NP_495489.2
<i>C. Oncophora</i>	<i>avr-14</i>	AVR-14a/GluCl α 3a	FN869115.1	CBM40945.1
		AVR-14b/GluCl α 3b	AY372756.1	AAR21855.1
	<i>glc-2</i>	GLC-2	AY372757.1	AAR21856.1
<i>H. contortus</i>	<i>avr-14</i>	AVR-14a/GBR2a/GluCl α 3a	Y14233.2	CAA74622.2
		AVR-14b/GBR2b/Glu α 3b	Y14234.1	CAA74623.1
		AVR-14c	JF309448.1	ADZ96468.1
	<i>glc-2</i>	GLC-2/GluCl1 β /HG4	Y09796.1	CAA70929.1
	<i>glc-3</i>	GLC-3	JF298242.1	ADZ57171.1
	<i>glc-4</i>	GLC-4	EU006788.1	ABV68894.1
	<i>glc-5</i>	GLC-5	AF076682.1	AAD13405.1
	<i>glc-6</i>	GLC-6	U006789.1	ABV68895.1

Tableau 2 : : Gènes et sous-unités décrites à ce jour chez les nématodes *C. elegans*, *C. oncophora* et *H. contortus*

Récepteur	Glutamate			EC50 ivermectine	Références
	I _{max} (μA)	EC ₅₀ (μM)	Coefficient de Hill		
Cel-AVR-14B	ND	2200 +/- 120	0.72 +/- 0.08	ND	McCavera et al, 2009
Cel-AVR-15a	ND	2000 +/- 300	1.5	ND	Dent et al, 1997
Cel-AVR-15b	5.7 +/- 0.5	208.3	2.1	107 nM	Vassilatis et al, 1997
Cel-GLC-1	Pas de réponse			140 +/- 15 nM	Cully et al, 1994
Cel-GLC-2	9.1 +/- 0.5	380 +/- 20	1.9 +/- 0.2	Pas de réponse	Cully et al, 1994
Cel-GLC-3	0.29 +/- 0.05	ND	ND	400 nM	Horoszok et al, 2001
Cel-AVR-15b/GLC-2	3.36 +/- 0.34	62	2.4	103 nM	Vassilatis et al, 1997
Cel-GLC-1/GLC-2	ND	1360 +/- 50	1.7 +/- 0.1	190 +/- 7 nM	Cully et al, 1994
Con-AVR-14b IVM S	5,9 +/- 0,4	29,7 +/- 4	2,4 +/- 0,21	500 +/- 120 nM	Njue et al, 2004
Con-AVR-14b IVM R	ND	96,1 +/- 4,4	2,4 +/- 0,45	1300 +/- 110 nM	Njue et al, 2004
Con-GLC-2 IVMS	0,3 +/- 0,01	185,6 +/- 24,9	2,2 +/- 0,02	Pas de réponse	Njue et al, 2004
Con-GLC-2 IVMR	Pas de réponse			Pas de réponse	Njue et al, 2004
Con-AVR-14b/GLC2 IVMS	ND	13,4 +/- 2,5	1,9 +/- 0,28	ND	Njue et al, 2004
Con-AVR-14b/GLC-2 IVMR	ND	171,6 +/- 20,7	2,5 +/- 0,28	ND	Njue et al, 2004
Dim-AVR-14B	ND	> 1 mM	ND	Sensible à 1 μM	Yates & Wolstenholme, 2004
Hco-AVR-14B	ND	28	1.9 +/- 0.3	22 +/- 3 nM	Atif et al, 2019
Hco-GLC-2	ND	394	1.5 +/- 0.1	> 10 μM	Atif et al, 2019
Hco-AVR-14B/GLC-2	ND	40	1.7 +/- 0.1	86 +/-14 nM	Atif et al, 2019
Hco-GLC-5	ND	8,4 +/- 0,56	2,13 +/-0,14	131 nM	Forrester et al, 2003

Tableau 3 : Résumé des connaissances sur la sensibilité des différents sous-types de GluClS décrits chez les nématodes *C. elegans* (Cel), *C. oncophora* (Con), *D. immitis* (Dim) et *H. contortus* (Hco). ND signifie Non Déterminé.

Parmi ces gènes, *avr-14* est très conservé chez les nématodes libres et parasites (223). Il a été identifié chez de nombreuses espèces dont *C. elegans* (17), *Ascaris suum* (224), *Cooperia oncophora* (170), *Dirofilaria immitis* (225), *H. contortus* (171,176,177,226) et *Ostertagia ostertagi* (178). Des sites d'épissages alternatifs présents sur ce gène permettent la synthèse des deux protéines AVR-14A et AVR-14B qui partagent la même partie N-terminale mais varient dans leur partie C-terminale. Dans chaque étude étudiant la fonctionnalité de ces deux sous-unités, il est décrit qu'AVR-14A ne forme pas de récepteurs fonctionnels homomériques (17,225). A l'inverse, la sous-unité AVR-14B est décrite comme formant des récepteurs homomériques sensibles au glutamate et à l'ivermectine chez *C. elegans*, *C. oncophora*, *D. immitis* et *H. contortus* (17,170,176,177,225). Pour *H. contortus* et *C. oncophora*, le récepteur AVR-14B est décrit comme étant sensible au glutamate à des concentrations de l'ordre du μM avec des EC₅₀ de 28 μM (177) et 29,7 +/- 4 μM (170), respectivement. A l'inverse, chez *C. elegans* et *D. immitis*, les EC₅₀ sont de l'ordre du mM (17,225). Par conséquent, des concentrations aussi élevées pour activer ces récepteurs interpellent quant à la fonctionnalité d'un tel récepteur *in vivo* et suggèrent qu'une association de plusieurs sous-unités est nécessaire pour augmenter la sensibilité du récepteur au glutamate. Aussi, AVR-14B est plus sensible à l'ivermectine que pour le glutamate (**Figure 20**) ce qui en fait une cible pharmacologique majeure des lactones macrocycliques.

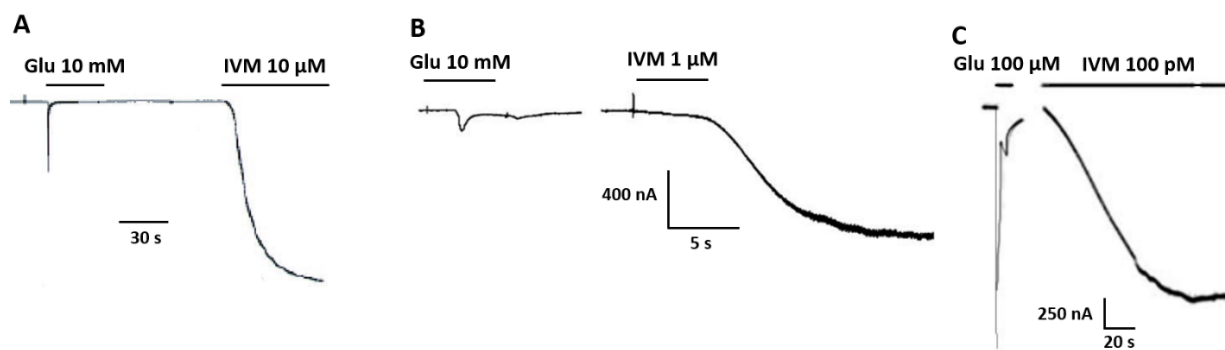


Figure 20 : Courants représentatifs d'un ovocyte de *Xenopus laevis* exprimant AVR-14B de *C. elegans* (A), de *D. immitis* (B) et d'*H. contortus* (C) en réponse à du glutamate (100μM-10 mM) puis de l'ivermectine (100pM-10 μM) (adaptée de Dent et al, 2000 ; Yates & Wolstenholme, 2004 ; McCavera et al, 2008)

GLC-1 (121) et AVR-15 (207) qui semblent être des sous-unités spécifiques de *C. elegans* sont capables de former des récepteurs homopentamériques fonctionnels. GLC-1 est sensible à l'ivermectine mais pas au glutamate tandis qu'AVR-15 est sensible au glutamate et à l'ivermectine. A l'inverse de GLC-1, GLC-2 est capable de former un récepteur homopentamérique fonctionnel sensible au glutamate mais pas à l'ivermectine chez *C. elegans* (121), *C. oncophora* (170) et *H. contortus* (177) ce qui en fait à ce jour le seul récepteur GluCl qui n'est pas sensible à l'ivermectine.

Parmi les autres récepteurs homomériques potentiels, GLC-3 n'a été décrit que chez *C. elegans* (227) mais le récepteur n'est activé qu'avec des concentrations en glutamate de l'ordre du millimolaire une fois exprimé en œufs de xénope. Comme pour AVR-14B, il est tentant d'émettre l'hypothèse que GLC-3 peut potentiellement s'associer à une ou plusieurs autres sous-unités pour augmenter sa sensibilité au glutamate. Cel-GLC-3 est aussi une cible de l'ivermectine. GLC-3 a également été identifié et décrit comme étant sensible à l'ivermectine chez le cyathostome *Cylicocyclus nassatus* (228).

La sous-unité *glc-4* est relativement divergente par rapport aux autres GluCl et forme un groupe à part bien qu'elle possède les sites caractéristiques d'une sous-unité GluCl (**Figure 19**). Actuellement, la fonction et la pharmacologie de GLC-4 restent inconnues quelle que soit l'espèce de nématode. Bien qu'il n'y ait que peu d'informations sur *glc-4*, une étude des génomes de nématodes de différents clades a mis en évidence que cette sous-unité était très conservée chez les *Nematoda*. GLC-4 et AVR-14 représentent les deux sous-unités les plus retrouvées chez les nématodes (223).

GLC-5 d'*H. contortus* forme le sous-type de GluCl le plus sensible au glutamate décrit à ce jour (EC_{50} glutamate de $8,4 \pm 0,56 \mu M$). Comme la plupart des autres GluCls, GLC-5 est activé par l'ivermectine (229–232). La sous-unité GLC-6 d'*H. contortus* a également été décrite comme étant impliquée dans la sensibilité à l'ivermectine. En effet, à la suite d'expériences de transgénèse dans le nématode modèle *C. elegans*, l'expression de Hco-GLC-6 dans un mutant de *C. elegans* résistant à l'ivermectine (souche DA1316 : *avr-14*, *avr-15*, *glc-1*) a permis de restaurer sa sensibilité à l'ivermectine (18). Les sous-unités *glc-5* et *glc-6* n'ont été caractérisées que chez le nématode parasite *H. contortus* et sont par conséquent des cibles particulièrement intéressantes pour le développement de nouveaux antiparasitaires spécifiques d'une espèce ou d'un type de parasites.

Si des combinaisons entre les sous-unités de GluCls peuvent potentiellement contribuer à la diversité de ces récepteurs, elles n'ont été que peu étudiées. Pourtant, les très fortes EC_{50} de glutamate (de l'ordre du mM) pour certaines sous-unités telles que AVR-14B (171) et GLC-3 (227) de *C. elegans* suggèrent que des associations avec d'autres sous-unités sont possibles voir nécessaires pour former des récepteurs fonctionnels avec des EC_{50} de l'ordre du μM .

A l'heure actuelle, seuls trois sous-types de GluCls hétéromériques ont été décrits : GLC-1/GLC-2, AVR-15/GLC-2 et AVR-14B/GLC-2. Chez *C. elegans*, GLC-2 est capable de s'associer aux sous-unités spécifiques de *C. elegans* GLC-1 (121) et AVR-15 (233) pour former des récepteurs sensibles au glutamate et à l'ivermectine. De même, AVR-14B s'associe à GLC-2 pour former un autre sous-type de GluCl sensible au glutamate et à l'ivermectine chez *Cooperia oncophora* (170) et *H. contortus* (177). GLC-2 étant sensible au glutamate mais pas à l'ivermectine, ces résultats suggèrent que la sensibilité à l'ivermectine est apportée par GLC-1, AVR-15 et AVR-14 et non par GLC-2. GLC-2 est la sous-unité commune entre ces trois sous-types de récepteurs hétéromériques et semble donc être une sous-unité très importante dans la formation de GluCls chez les nématodes.

A ce jour, aucune caractérisation fonctionnelle n'a été faite sur les GluCls de *B. malayi* mais les séquences des ARNm d'*avr-14a* ([HQ123446.1](#)) et d'*avr-14b* ([HQ123447.1](#)) ont été précédemment annotées par Moreno et al, 2010 (234). Pour *Parascaris sp.*, seule une séquence d'ADNc d'*avr-14b* a été annotée dans Genbank ([EF012200.1](#)) par Strube et al, 2006. Aucune caractérisations fonctionnelle et pharmacologique n'ont été réalisées sur ces sous-unités. Bien que les lactones macrocycliques soient restées efficaces après des décennies d'utilisation, le manque d'alternatives thérapeutiques et l'émergence de plus en plus de parasites résistants (notamment pour *Parascaris sp.*) rend l'étude des GluCls nécessaire et urgente pour les besoins en santé humaine et animale.

b. Localisation

Les GluClS de nématodes sont exprimés dans différents tissus. Leur localisation et leur expression tissulaire varient suivant la sous-unité. Cela inclue le système nerveux, les muscles du pharynx, les organes reproducteurs et les tissus localisés autour du pore excréteur (**Tableau 4**).

L'expression du promoteur de *Cel-avr-14* (17) montre une localisation dans le système nerveux (anneau nerveux, queue) qui est corrélée aux observations faites au niveau protéique pour AVR-14a et AVR-14b de *H. contortus* et d'*A. suum* avec l'utilisation d'anticorps spécifiques (224). Pour *H. contortus* (224) et *C. elegans* (7), *avr-14* est également exprimé dans des neurones moteurs. En revanche, chez *B. malayi*, la localisation d'*avr-14* est différente. En effet, l'immunolocalisation de Bma-AVR-14 est retrouvée dans les tissus entourant le pore excréteur (234) et l'expression des ARNm de cette sous-unité a été observée dans les tissus reproducteurs mâles et femelles (canal déférent et ovaires) ainsi que dans les cordons nerveux latéraux, dans les embryons et dans l'utérus des microfilaires (235). Cependant, seule l'étude de Jagannathan et al, 1999 (224) permet de différencier la localisation d'expression des sous-unités AVR-14a et AVR-14b.

Specie	Subunit	Location	Development stage	References
<i>A. suum</i>	AVR-14	Ventral and dorsal nerve cord, tail	Adult	<i>Jagannathan et al, 1999</i>
<i>B. malayi</i>	AVR-14	Tissue surrounding the excretory/secretory vesicle, vas deferent Ovary, developping embryos, lateral chords	Microfilariae Adult (male) Adult (female)	<i>Moreno et al, 2010 ; Li et al, 2014</i>
<i>C. elegans</i>	AVR-14	Extrapharyngeal neurons in the head (ring ganglia/nerve ring), sensory neurons, ventral cord motor neurons, amphidial neurons of the head, phasmid neurons of the tail	Adult	<i>Dent et al, 2000 ; Frankz et al, 2006</i>
<i>C. elegans</i>	AVR-15	Pharyngeal muscles pm4 and pm5, motor neurons of the head, ventral cord	Adult	<i>Dent et al, 1997</i>
<i>C. elegans</i>	GLC-1	?		
<i>C. elegans</i>	GLC-2	Pharyngeal muscles pm4 and pm5	All larval stages and adult	<i>Laughton et al, 1997</i>
<i>C. elegans</i>	GLC-3	Potentially expressed in AIY neuron	Adult	<i>Chalasani et al, 2007 ; Wenick & Hobert, 2004</i>
<i>C. elegans</i>	GLC-4	?		
<i>H. contortus</i>	AVR-14	Nerve ring, ventral and dorsal nerve cords, motor neurons commissures, tail, pharyngeal motor neuron cell bodies (M1 and M2)	Adult	<i>Portillo et al, 2003 ; Jagannathan et al, 1999</i>
<i>H. contortus</i>	GLC-2	Motor neuron commissures, lateral and sublateral nerve cords, commissures from dorsal and ventral nerve cords	Adult	<i>Portillo et al, 2003 ; Delany et al, 1998</i>
<i>H. contortus</i>	GLC-5	Motor neuron commissures	Adult	<i>Portillo et al, 2003</i>

Tableau 4 : Localisation des sous-unités de GluCl décrites chez les nématodes *A. suum*, *C. elegans*, *B. malayi* et *H. contortus*

Chez *C. elegans*, *glc-2* et *avr-15* sont exprimées dans les muscles pm4 et pm5 du pharynx (207,236) et peuvent donc potentiellement s'associer pour former un récepteur hétéromérique *in vivo* comme cela a été démontré en œufs de xénope (233). Bien que *Cel-glc-2* n'ait pas été observée dans d'autres tissus, *Cel-avr-15* est également exprimée dans des neurones moteurs de la tête et dans le cordon nerveux ventral (207). Comme c'était le cas pour *avr-14*, *glc-2* présente une différence d'expression entre les nématodes *C. elegans* et *H. contortus*. Chez *C. elegans* *glc-2* est exprimée dans les muscles du pharynx tandis que pour *H. contortus* GLC-2 est exprimée dans les cordons nerveux latéraux et sublatéraux, aux commissures des neurones moteurs, des cordons nerveux dorsaux et ventraux mais pas dans les muscles du pharynx (237,238).

Chez *C. elegans*, *glc-3* possède dans sa séquence une signature d'expression dans le neurone AIY (239) qui est impliqué dans le changement de sens de mouvement du ver à la suite d'un stimuli odorant ou d'un changement de température (240).

Enfin *glc-5* de *H. contortus* est exprimée dans les commissures de neurones moteurs (237).

Bien que très dépendant de la qualité des anticorps utilisés pour l'immunolocalisation des sous-unités, ces études montrent que la localisation de chaque sous-unité semble varier suivant l'espèce de nématode, le stade de développement et le sexe suggérant des fonctions différentes suivant l'espèce, le stade et le sexe des nématodes.

c. Fonctions

La distribution spatio-temporelle des sous-unités de GluCl suggère une implication des récepteurs dans différents processus physiologiques modulateurs impliquant le système nerveux tels que la locomotion, les activités liées au pharynx (recherche de nourriture), la réaction à des stimulus sensoriels et l'excrétion de molécules. De plus, l'application d'ivermectine sur les nématodes entraîne des dysfonctionnements de la reproduction et de la fécondité suggérant un rôle des GluCls dans ces fonctions (115).

Certains GluCls sont impliqués dans la modulation de la locomotion ce qui explique l'expression de certains gènes dans les neurones moteurs (**Tableau 4**, Hco-AVR-14, Hco-GLC-2, Hco-GLC-5). Chez *C. elegans*, des mutations des gènes *avr-14*, *avr-15*, *glc-1* et/ou *glc-3* changent le comportement du ver (17,18). En effet, prises indépendamment, les mutations de les trois gènes *avr-14*, *avr-15* et *glc-1* augmentent la fréquence à laquelle le ver change de direction suggérant un rôle de régulateur dans le changement de direction (17). A l'inverse, une mutation dans *glc-3* augmente cette fréquence ce qui est cohérent avec sa localisation hypothétique dans le neurone AIY (239). Sans stimulus, le neurone AWC est activé et inhibe le changement de direction en inhibant le neurone AIY via GLC-3 (l'activation de GLC-3 par le glutamate entraîne une hyperpolarisation qui inhibe le neurone AIY). En revanche, lorsque le neurone AWC reçoit les informations des neurones senseurs répondant aux odeurs et aux changements de température, il est inhibé ce qui permet l'activation du neurone AIY. Cela favorise le changement de direction du ver qui se dirigera vers un lieu avec une température plus adéquate ou vers une source de nourriture (240). De façon surprenante, le remplacement de la sous-unité *Cel-avr-14* par *Hco-avr-14b* diminue la fréquence de changement de direction suggérant des rôles différents d'*avr-14* en fonction de l'espèce de nématode ce qui est cohérent avec les différences de localisation observées. Les auteurs expliquent ce phénomène par la plus grande affinité au glutamate de *Hco-avr-14b* par rapport à *Cel-avr-14b*, qui serait donc un activateur du changement de direction (18).

Aussi, des mutations d'*avr-14* et d'*avr-15* ont montré leur implication dans la recherche de nourriture via l'activité du pharynx. La présence d'*avr-15* dans les muscles du pharynx facilite sa relaxation et inhibe l'activité de pompage (207,241) avec également une potentielle implication de *glc-2* (236).

2. GluClS d'insectes

a. Récepteurs décrits

Contrairement aux nématodes, les insectes ne possèdent qu'un seul gène codant pour des GluClS. Tout comme pour les nématodes, il a été décrit que l'activité des lactones macrocycliques est principalement médiée par leur fixation aux GluClS d'insectes. La recherche des cibles de l'ivermectine chez les insectes a dans un premier temps permis l'identification du GluCl de l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* qui présente une sensibilité à l'ivermectine (206). Par la suite, les GluClS de nombreuses espèces d'insectes ont été caractérisés telles que *Apis mellifera* (218), *Anopheles gambiae* (242), *Bombyx mori* (243), *Caligus rogercresseyi* (134), *Ixodes scapularis* (244), *Laodelphax striatellus* (245), *Musca domestica* (116,246,247), *Plutella xylostella* (248), *Rhipicephalus microplus* (249), *Tetranychus cinnabarinus* (250) et *Tetranychus urticae* (148).

Bien que n'ayant qu'un seul gène de GluCl, la diversité des sous-unités des GluClS d'insectes est générée par des événements d'épissages alternatifs ainsi que par des phénomènes d'édition des transcrits appelés A-to-I editing (219,251). Bien que ces phénomènes n'engendrent que peu de différences au niveau de la séquence protéique des GluClS, elles sont suffisantes pour que les différents variants aient des propriétés pharmacologiques, des localisations et des rôles physiologiques différents.

Certains variants de GluCl sont capables de former des récepteurs homomériques fonctionnels tandis que d'autres modifient la pharmacologie d'autres variants. Parmi les récepteurs décrits, leur sensibilité au glutamate et à l'ivermectine dépend du variant ainsi que de l'espèce étudiée. Chez les arthropodes, les EC₅₀ du glutamate varient de 6,89 µM chez le copépode *Caligus rogercresseyi* à 3,019 mM chez l'acarien *Tetranychus cinnabarinus* (Tableau 5).

Espèce	Récepteur	Glutamate		EC50 ivermectin	Références
		EC50 (µM)	Hill coeff		
<i>A. gambiae</i>	GluCl-b1	19 +/- 1	1,33 +/- 0,18	145 +/- 13 nM	Atif et al, 2019
	GluCl-c	27 +/- 1	ND	202 +/- 50 nM	Atif et al, 2019
<i>B. mori</i>	GluCl	245	ND	588 nM	Furutani et al, 2017
<i>C. rogercresseyi</i>	GluCl-α	6,9 +/- 0,8	ND	181 +/- 10 nM	Cornejo et al, 2014
<i>D. melanogaster</i>	GluCl-α	23	2,0	41 nM	Cully et al, 1996
<i>I. scapularis</i>	GluCl-1	230	ND	1,95 µM	Furutani et al, 2018
<i>L. striatellus</i>	GluCl-AS	38,1 +/- 7,7	2,43 +/- 0,23	ND	Wu et al, 2016
	GluCl-AL	18,7 +/- 3,5	2,05 +/- 0,15	ND	Wu et al, 2016
<i>M. domestica</i>	GluCl	7,9 +/- 1,2	2,09 +/- 0,19	13,5 +/- 3,8 nM	Fuse et al, 2016, Nakata et al, 2017, Eguchi et al, 2006
<i>P. xylostella</i>	GluCl-α-N	52,6	ND	ND	Liu et al, 2014
	GluCl-α-D	689,7	ND	ND	Liu et al, 2014
<i>R. microplus</i>	GluCl	17,8 +/- 2,8	1,10 +/- 0,07	ND	Gassel et al, 2014
<i>T. cinnabarinus</i>	GluCl-1	2884 +/- 47	1,81 +/- 0,32	ND	Xu et al, 2017
	GluCl-2	3019 +/- 35	2,14 +/- 320	ND	Xu et al, 2017
	GluCl-3	2983 +/- 18	2,43 +/- 0,21	ND	Xu et al, 2017
	GluC-4	2851 +/- 34	1,75 +/- 0,22	ND	Xu et al, 2017
	GluC-5	2701 +/- 38	1,71 +/- 0,23	ND	Xu et al, 2017
<i>T. urticae</i>	GluCl-3	384,2	1,47 +/- 0,16	ND	Mermans et al, 2017

Tableau 5: Résumé des connaissances sur la fonctionnalité des GluClS décrits chez les arthropodes

b. Localisations et fonctions

L'étude de l'expression des transcrits (RT-PCRq) de GluCls de la cicadelle brune *Laodelphax striatellus* à différents stades et dans les différents segments, a révélé une présence abondante d'ARNm dans la tête des adultes mais également plus faiblement dans le thorax, l'abdomen et les pattes (245) suggérant un rôle dans les processus sensoriels majoritairement perçus par la tête. D'autres expériences de qRT-PCR chez plusieurs espèces d'insectes (*Mythimna separata* et *Chilo suppressalis*) montrent également une présence préférentielle des transcrits au niveau de la tête (252,253).

Chez *A. mellifera*, deux variants de GluCls (A et B) ont été identifiés et localisés dans la tête et notamment au niveau des lobes antennaires, des corps de champignons et des lobes optiques avec une préférence pour les neuropiles pour la forme GluCl-A et les corps cellulaires pour la forme GluCl-B (215). La différence de localisation de ces sous-unités peut expliquer leur implication différentielle dans les fonctions biologiques de l'abeille. L'utilisation de pARNi (petits ARN interférents ou siRNA) spécifiques de chaque sous-unité a mis en évidence le rôle de GluCl-A dans la mémoire olfactive tandis que GluCl-B est impliquée dans la perception des odeurs (211) ce qui est cohérent avec les fonctions connues des corps champignons (processus d'apprentissage et de mémoire).

De façon similaire, chez le moustique *Anopheles gambiae*, l'utilisation d'anticorps dirigés contre plusieurs variants de GluCls a montré une expression dans les antennes, l'organe Johnston (amas de cellules sensorielles au bout des antennes), le ganglion supraesophagéal et le ganglion thoracique. L'organe Johnston a des fonctions dans l'audition et la coordination lors de vols tandis que les ganglions contiennent des neurones moteurs nécessaires au contrôle des ailes et des muscles des pattes. Ces localisations suggèrent une implication des GluCls dans les fonctions d'audition et de mouvements (254).

Aussi, la localisation des GluCls d'*A. mellifera* et *A. gambiae* dans les lobes optiques suggère un rôle des GluCls dans des processus associés à la vision (215,254).

Chez la blatte *Diploptera punctata*, les GluCls inhibent la synthèse de l'hormone juvénile nécessaire au développement post-embryonnaire des insectes (255) suggérant un rôle des GluCls dans le développement des insectes. De plus, cette hormone a également un impact sur la mémoire olfactive des abeilles (256) ce qui confirme que les GluCls ont un rôle dans ces processus mémoriels.

E. Récepteurs au GABA des insectes

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux des vertébrés et des invertébrés. Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Cependant, les récepteurs au GABA des invertébrés n'ont pas d'homologues chez les vertébrés, et inversement. Des analyses phylogénétiques montrent que les sous-unités alpha et gamma des récepteurs au GABA de vertébrés forment un groupe à part se rapprochant des sous-unités GRD et 8916. Les sous-unités beta clusterisent avec les sous-unités LCCH3 des invertébrés (**Figure 21**). Bien qu'il n'y ait pas de distinctions phylogénétiques claires entre les sous-unités de récepteurs au GABA de vertébrés et d'invertébrés, des différences notables sont observées au niveau des acides aminés impliqués dans les interactions avec les insecticides tels que l'ivermectine et le fluralaner (**Figure 22**). Cela en fait des cibles pharmacologiques pertinentes pour le développement de molécules antiparasitaires qui n'auraient donc pas de cibles chez les vertébrés, limitant ainsi les effets secondaires potentiels. De plus, les récepteurs au GABA sont les cibles de nombreux insecticides (isoxazolines, fipronil, dieldrin...) et anthelminthiques efficaces (ivermectine), ce qui confirme leur intérêt en tant que cible pharmacologique pour le développement de nouveaux composés. Chez les insectes, quatre gènes codant pour des sous-unités de récepteurs au GABA ont été identifiés : resistant to dieldrin (*rdl*), GABA and glycine-like receptor of *Drosophila* (*grd*), ligand-gated chloride channel homologue 3 (*lcch3*) et 8916 (219).

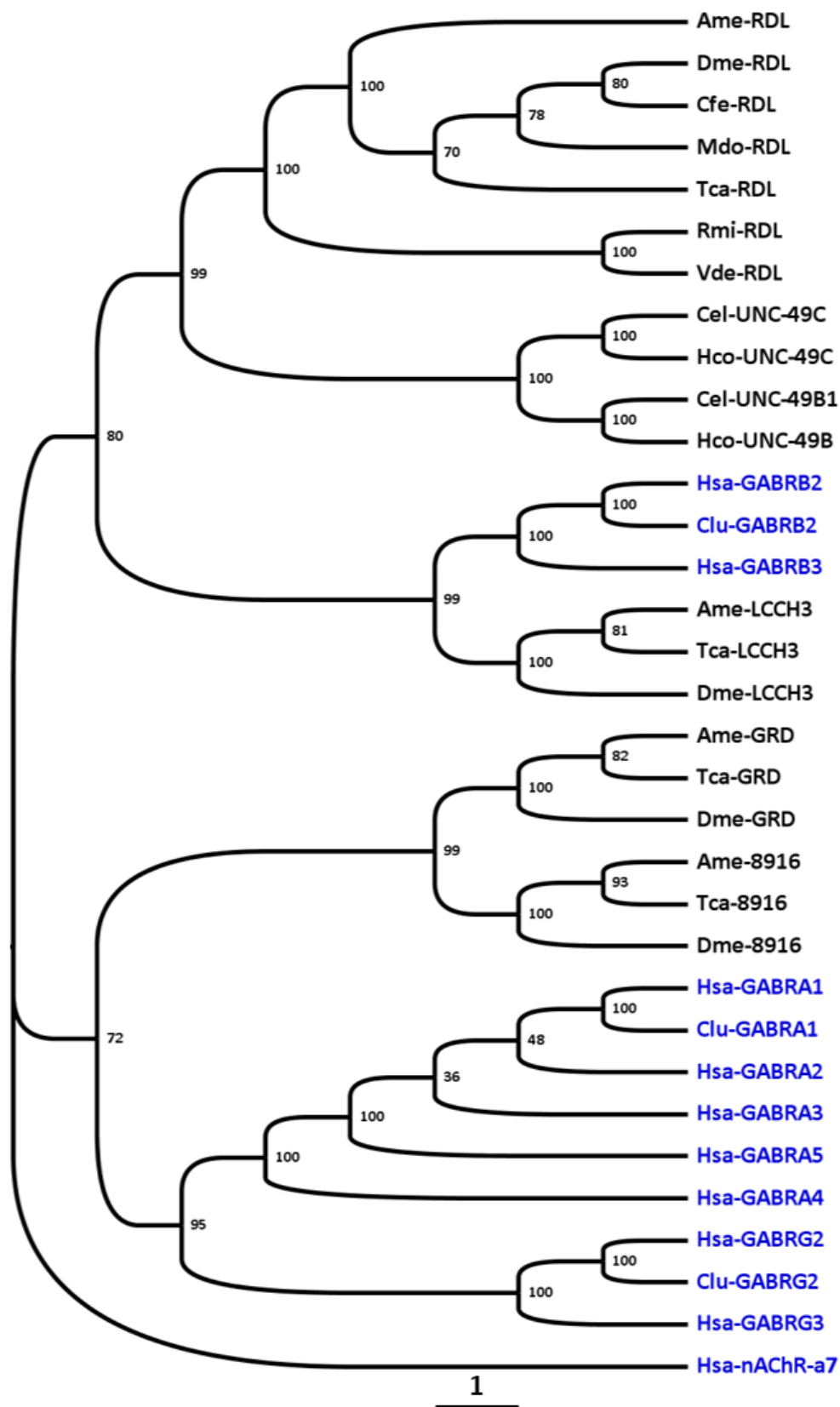


Figure 21 : Arbre phylogénétique de distance (BioNJ) de sous-unités de récepteurs au GABA des invertébrés et des vertébrés. Les espèces d'invertébrés représentées sont *A. mellifera* (Ame), *C. elegans* (Cel), *C. felis* (Cfe), *D. melanogaster* (Dme), *H. contortus* (Hco), *M. domestica* (Mdo), *R. microplus* (Rmi), *T. castaneum* (Tca) et *V. destructor* (Vde). Les espèces de vertébrés sont *H. sapiens* (Hsa) et *C. lupus* (Clu) et leurs sous-unités respectives sont indiqués en bleu. Les valeurs de bootstraps (1000 réplicats) sont indiquées à chaque nœud. L'échelle représente le nombre de substitution par site.

Ame-RDL	:	TTSNEFIRIHSGSITRSIRLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGYTMRDIRYKWNENGP-SVGVSNEVS--LPQF	:	220
Dme-RDL	:	TTSNEFIRVHSGSITRSIRLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGYTMRDIRYKWNENGP-SVGVSSEVS--LPQF	:	235
Rmi-RDL	:	TPNTFLRIGSGGEVFRSIRLTITASCPMDLRYFPMDRQACTIEIESFGYTMKDIRYRWSGDGT-SVRIAKEVE--LPQF	:	220
Hsa-GABRA1	:	TMPNKLRLITEDGTLTYLTMRLTVRAECPMHLEDFPMDAHACPLKFGSYAYPRAEVVYEWTRPARSVVVAEDGS-RLNQY	:	218
Hsa-GABRA2	:	TMPNKLRLIQDDGTLTYLTMRLTVQAECPMHLEDFPMDAHACPLKFGSYAYTTSEVYIWTYNASDSVQVAPDGS-RLNQY	:	218
Hsa-GABRA3	:	TTPNKLRLRLVDNGTLTYLTMRLTIAECPMHLEDFPMDVHACPLKFGSYAYTTAEVVYSWTLGKNKSVEVAQDGS-RLNQY	:	243
Hsa-GABRA4	:	TAPNKLFRIMRNGTILYTMRLTISAECPMRLVDFFPMDGHACPLKFGSYAYPKSEMIYTWTKGPEKSVEVPKES-SLVQY	:	224
Hsa-GABRA5	:	TTPNKLRLLEDDGTLTYLTMRLTISAECPMQLEDFPMDAHACPLKFGSYAYPNSEVVYVWTNGSTKSVVVAEDGS-RLNQY	:	225
Hsa-GABRB2	:	TVKNRMIRLHPDGTVLVYGLRITTTAACMMDLRRYPLDEQNCLEIESYGYTTDDIEFYWRGDDN-AVTGVTKIE--LPQF	:	210
Hsa-GABRB3	:	TVKNRMIRLHPDGTVLVYGLRITTTAACMMDLRRYPLDEQNCLEIESYGYTTDDIEFYWRGGDK-AVTGVERIE--LPQF	:	211
Hsa-GABRG2	:	TTPNRLRLIWNDRVLYTLRLTIDAECQLQLHNFPMDEHSCPLEFSSYGYPREEIVYQWKRS---SVEVDTRSWRLYQF	:	240
Hsa-GABRG3	:	TTPNQLRLIWNDRGKILYTLRLTINAECQLQLHNFPMDEHSCPLIFSSYGYPKEEMIYRWRKN---SVEAADQKSWRLYQF	:	221
Clu-GABRA1	:	TMPNKLRLRITEDGTLTYLTMRLTVRAECPMHLEDFPMDAHACPLKFGSYAYTRAEVVYEWTRPARSVVVAEDGS-RLNQY	:	218
Clu-GABRB2	:	TVKNRMIRLHPDGTVLVYGLRITTTAACMMDLRRYPLDEQNCLEIESYGYTTDDIEFYWRGDDN-AVTGVTKIE--LPQF	:	210
Clu-GABRG2	:	TTPNRLRLIWNDRVLYTLRLTIDAECQLQLHNFPMDEHSCPLEFSSYGYPREEIVYQWKRS---SVEVDTRSWRLYQF	:	240

TM1

TM2

Ame-RDL	:	KVLGHRQRAMEISLTTGNYSRLACEIQFVRS	MGYYLIQIYTPSG	LIVVISWVSFWLNRNATPARVALGVT	TVLTMTTLS	:	300
Dme-RDL	:	KVLGHRQRAMEISLTTGNYSRLACEIQFVRS	MGYYLIQIYTPSG	LIVVISWVSFWLNRNATPARVALGVT	TVLTMTTLS	:	315
Rmi-RDL	:	KVLGHVQKAKEVALTTGNYSRLVCEIRFARSMGYYLIQIYTPAG	LIVVISWVSFWLHRNASPARVALGVT	TVLTMTTLS	:	300	
Hsa-GABRA1	:	DLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTHFHLKRRKIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSEFWLNRRESVPARTVFGVT	TVLTMTTLSI	:	298		
Hsa-GABRA2	:	DLGQSGIKETIKSSTGEYTVMTAHFHLKRRKIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSEFWLNRRESVPARTVFGVT	TVLTMTTLSI	:	298		
Hsa-GABRA3	:	DLGQTVGTEIIRSSTGEYVVMTHFHLKRRKIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSEFWLNRRESVPARTVFGVT	TVLTMTTLSI	:	323		
Hsa-GABRA4	:	DLIGQTVSSETIKSITGEYIVMTYVYFHLRKRKMGYFMIQTYIPCMITVILSQVSEFWINKESVPARTVFGIT	TVLTMTTLSI	:	304		
Hsa-GABRA5	:	HLMGQTVGTENISTSTGEYTIMTAHFHLKRRKIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSEFWLNRRESVPARTVFGVT	TVLTMTTLSI	:	305		
Hsa-GABRB2	:	SIVDYKLITKKVVFSTGSYPRLSLSFKLRNIGYFIQTYMPSILITILSWVSFWINYDASAARVALGIT	TVLTMTTINT	:	290		
Hsa-GABRB3	:	SIVEHRLVSRNVVFATGAYPRLSLSFRLKRNIGYFIQTYMPSILITILSWVSFWINYDASAARVALGIT	TVLTMTTINT	:	291		
Hsa-GABRG2	:	SFVGLRNTTEVVKTTSGDYVVMVSFYFDLSRRMGYFTIQTYIPCTII	IVVLSWVSFWINKDAVPARTSLGIT	TVLTMTTLST	:	320	
Hsa-GABRG3	:	DFMGLRNTTEIVTTSAGDYVVMTIYFELSRRMGYFTIQTYIPCI	ITVVLVSWVSFWIKKDATPARTALGIT	TVLTMTTLST	:	301	
Clu-GABRA1	:	DLGQTVDSGIVQSSTGEYVVMTHFHLKRRKIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSEFWLNRRESVPARTVFGVT	TVLTMTTLSI	:	298		
Clu-GABRB2	:	SIVDYKLITKKVVFSTGSYPRLSLSFKLRNIGYFIQTYMPSILITILSWVSFWINYDASAARVALGIT	TVLTMTTINT	:	290		
Clu-GABRG2	:	SFVGLRNTTEVVKTTSGDYVVMVSFYFDLSRRMGYFTIQTYIPCTII	IVVLSWVSFWINKDAVPARTSLGIT	TVLTMTTLST	:	320	

TM3

Ame-RDL	:	STNAALPKISYVKSIDVYLGTCTCFVMVFASLLEYATVGYM-----	:	339
Dme-RDL	:	STNAALPKISYVKSIDVYLGTCTCFVMVFASLLEYATVGYM-----	:	354
Rmi-RDL	:	STNAALPKISYVKSIDVYLGTCTCFVMVFATLLEYAAGVYL-----	:	339
Hsa-GABRA1	:	SARNSLPKVAYATAMDWFIACVYAFVFSALIEFATVNYFTKRGYAWDGKSVVPE-KPKVKDPL- IKKN-NTYAPTATSY	:	375
Hsa-GABRA2	:	SARNSLPKVAYATAMDWFIACVYAFVFSALIEFATVNYFTKRGWTWDGKSVVND-K-KKEKASV-MIQN-NAYAVAVANY	:	374
Hsa-GABRA3	:	SARNSLPKVAYATAMDWFIACVYAFVFSALIEFATVNYFTKRSAWEGKKVPEALEMKKKTPAAPAKKTSTTFNIVGTTY	:	403
Hsa-GABRA4	:	SARHSLPKVSYLTAMDWFIACVAFVFSALIEFAAVNYFT-----	:	344
Hsa-GABRA5	:	SARNSLPKVAYATAMDWFIACVYAFVFSALIEFATVNYFTKRGAWDGKKALEAAKIKKKREVI-LNKSTNAFTTGKMSH	:	384
Hsa-GABRB2	:	HLRETLPKIPYVKAIDMYLMGCFVVFEMALLEYALVNYI-----	:	329
Hsa-GABRB3	:	HLRETLPKIPYVKAIDMYLMGCFVVFELALLEYAFVNYI-----	:	330
Hsa-GABRG2	:	IARKSLPKVSYVTAMDLFVSVCFIFVFSALVEYGLTHYF-----	:	359
Hsa-GABRG3	:	IARKSLPRVSYVTAMDLFVTVCFLFVFAALMEYATLNYY-----	:	340
Clu-GABRA1	:	SARNSLPKVAYATAMDWFIACVYAFVFSALIEFATVNYFTKRGYAWDGKSVVPE-KPKVKDPL- IKKN-NTYAPTATSY	:	375
Clu-GABRB2	:	HLRETLPKIPYVKAIDMYLMGCFVVFEMALLEYALVNYI-----	:	329
Clu-GABRG2	:	IARKSLPKVSYVTAMDLFVSVCFIFVFSALVEYGLTHYF-----	:	359

Figure 22 : Alignement des séquences protéiques de sous-unités de GABAC1 des vertébrés *Homo sapiens* (Hsa) et *Canis lupus* (Clu), et des invertébrés *A. mellifera* (Ame), *D. melanogaster* (Dme) et *R. microplus* (Rmi)

Les domaines transmembranaires TM1-3 sont surlignés en gris et indiqués par des barres noires au dessus des séquences. Les acides aminés impliqués dans l'interaction à l'ivermectine sont surlignés en vert. Les acides aminés impliqués dans l'interaction au fluralaner sont surlignés en violet. Les acides aminés impliqués dans les interactions à l'ivermectine et au fluralaner sont surlignés en rouge.

1. Récepteur RDL (Resistant to Dieldrin)

a. Pharmacologie

Parmi les quatre sous-unités décrites chez les insectes, la sous-unité *rdl* a été découverte en criblant des mutants de l'organisme modèle *D. melanogaster* résistant à la dieldrine (257). Les sous-unités RDL d'autres espèces d'insectes sont très conservées et ont un motif PAR au début de leur TM2 qui est nécessaire pour la formation d'un canal ionique perméable aux anions (258). A l'inverse, les sous-unités GRD et LCCH3 n'ont pas ce motif et sont des récepteurs cationiques (259) (**Figure 23**).

	TM1		TM2		TM3	
Ame-RDL	: ISWVSFWLN	NRNATPARVALGV	TTVLTMT	TLMSSTNAALPKISYVKSI	IVYLGTCFVMVFASLLEYATVGYM	: 339
Dme-RDL	: ISWVSFWLN	NRNATPARVALGV	TTVLTMT	TLMSSTNAALPKISYVKSI	IVYLGTCFVMVFASLLEYATVGYM	: 354
Ame-GRD	: LSWVSFWLN	REATA	DRVSLGITTTVLTMT	FLGLEARTDLPKVPYPTALDFFVFLS	FAFIFATIIQFAVVHY-	: 350
Dme-GRD	: LSWVSFWLN	REATA	DRVSLGITTTVLTMT	FLGLEARTDLPKVSYP	TALDFFVFLSFGFIFATILQFAVVHY-	: 477
Ame-LCCH3	: LSWVSFWIN	HEATSARVALGITTTVLTMT	TISTGVRSSLPRISYVKAI	DIYLMCEVFVF	FAALLEYAAVNY-	: 327
Dme-LCCH3	: LSWVSFWIN	HEATSARVALGITTTVLTMT	TISTGVRSSLPRISYVKAI	DIYLMCEVFVF	FAALLEYAAVNY-	: 342

Figure 23 : Alignement des séquences protéiques de sous-unités de RDL, GRD et LCCH3 des insectes *A. mellifera* (Ame) et *D. melanogaster* (Dme) et *R. microplus* (Rmi)

Les domaines transmembranaires TM1-3 sont indiqués par des barres noires au dessus des séquences. Les acides aminés en communs entre les trois séquences sont surlignés en bleu. Le motif PAR des canaux ioniques perméable aux anions est indiqué par des étoiles rouges au dessus des séquences.

Des analyses génomiques ont montré que plusieurs sous-unités de RDL sont codées par un seul gène chez une large gamme d'insectes tels que *A. mellifera* (218), *N. vitripennis* (216) et *T. castaneum* (217). Chez les insectes, comme pour les GluCl_s, la diversité des sous-unité provient d'épissages alternatifs (260–262) et de A-to-I edditng (251). Le nombre de variants identifiés diffère selon l'espèce d'arthropode étudiée. Ainsi, des orthologues de RDL ont été identifiés chez certains arthropodes mais seulement quelques-uns ont été caractérisés au niveau fonctionnel (**Tableau 6**), incluant *Acyrtosiphon pisum* (260), *Anopheles gambiae* (263), *Apis mellifera* (218,259), *Cyrtorhinus lividipennis* (264), *Derma-centor variabilis* (265), *Drosophila melanogaster* (266), *Drosophila simulans* (267), *Lepeophtheirus salmonis* (187), *Laodelphax striatellus* (268), *Musca domestica* (116,247), *Nilaparvata lugens* (264,269), *Rhipicephalus microplus* (187), *Tetranychus cinnabarinus* (270) et *Varroa destructor* (271). Les sous-unités RDL forment des récepteurs homomériques sensibles au GABA avec des EC₅₀ variant de 3,8 +/- 0,3 µM chez *Laodelphax striatellus* (268) et 445 +/- 47 µM chez l'araignée *Tetranychus cinnabarinus* (250) avec l'exception de RDL-2 du parasite d'abeille *Varroa destructor* (2,4 +/- 0,3 µM) (271). Bien que les récepteurs au GABA soit des cibles reconnues de l'ivermectine, leur sensibilité à cette molécule est très variable et dépend de la sous-unité et de l'espèce. Les valeurs d'EC₅₀ à l'ivermectine vont de la dizaine de nanomolaires (42 +/- 7,7 nM pour RDL de *M. domestica*) à la dizaine de micromolaires (> 10 µM pour les sous-unités RDL de *T. cinnabarinus*) (**Tableau 6**).

Espèce	Récepteur	GABA		EC50 ivermectin	Références
		EC50 (μM)	Hill coeff		
<i>A. pisum</i>	RDL1	51 +/- 9,2	2,0 +/- 0,3	ND	Del Villar et al, 2018
	RDL2	28 +/- 5,4	1,0 +/- 0,1	ND	Del Villar et al, 2018
<i>A. gambiae</i>	RDL	95 +/- 32	1,35 +/- 0,27	ND	Taylor et al, 2017
<i>A. mellifera</i>	RDL-1	24,29	2,01	181,18 nM	Henry et al, 2020; Taylor et al, 2017
	RDL-2	20 +/- 2	1,13 +/- 0,06	ND	Taylor et al, 2017
	RDL-3	29 +/- 8	1,70 +/- 0,15	ND	Taylor et al, 2017
<i>C. lividipennis</i>	RDL	16,2 +/- 3,2	1,6 +/- 0,13	ND	Jiang et al, 2015
<i>D. variabilis</i>	RDL	ND (1 mM)	ND	ND (> 100 nM)	Zheng et al, 2003
<i>D. melanogaster</i>	RDL	152 +/- 10	1,72 +/- 0,07	ND	Chen et al, 1994
<i>D. simulans</i>	RDL	70 +/- 7	1,64 +/- 0,05	ND	Le Goff et al, 2005
<i>L. salmonis</i>	RDL	392 +/- 11	1,35 +/- 0,04	ND	Rufener et al, 2017
<i>L. striatellus</i>	RDL-a	3,8 +/- 0,3	1,50	ND	Jiang et al, 2020
	RDL-b	12,3 +/- 0,7	1,88	ND	Jiang et al, 2020
	RDL-c	22 +/- 0,9	2,24	ND	Jiang et al, 2020
<i>M. domestica</i>	RDL	17,9 +/- 1,6	1,89 +/- 0,09	42 +/- 7,7 nM	Fuse et al, 2016; Eguchi et al, 2006
<i>N. lugens</i>	RDL	37,7 +/- 5,4	1,74 +/- 0,11	ND	Jiang et al, 2015
<i>R. microplus</i>	RDL	50 +/- 0,7	2,27 +/- 0,19	ND	Rufener et al, 2017 ; Gassel et al, 2014
<i>T. cinnabarinus</i>	RDL-1	445 +/- 47	1,29 +/- 0,16	> 10 μM	Xu et al, 2017
	RDL-2	677 +/- 42	1,99 +/- 0,40	> 10 μM	Xu et al, 2017
	RDL-3	1086 +/- 32	2,26 +/- 0,36	> 10 μM	Xu et al, 2017
<i>V. destructor</i>	RDL-1	92 +/- 10	2,3 +/- 0,1	ND	Ménard et al, 2018
	RDL-2	2,4 +/- 0,3	2,5 +/- 0,1	ND	Ménard et al, 2018
	RDL-3	37 +/- 4	2,5 +/- 0,3	ND	Ménard et al, 2018
	RDL-4	> 100 μM	ND	ND	Ménard et al, 2018

Tableau 6: Résumé des connaissances sur la fonctionnalité des sous-unités RDL décrites chez les arthropodes

RDL est un récepteur modèle pour l'étude des récepteurs au GABA des insectes car c'est une cible majeure de nombreux insecticides actuellement commercialisés tels que le fipronil utilisé en médecine vétérinaire et pour la protection des cultures (272), ou plus récemment la famille des isoxazolines utilisée contre les ectoparasites (puces et acariens) des chiens et des chats (185). Ce récepteur est également porteur de mutations conférant des résistances aux insecticides. En effet, une substitution d'un acide aminé du TM2 (Ala 302 → Ser) de RDL retrouvée chez une souche de *D. melanogaster* résistante aux insecticides entraîne une perte de sensibilité du récepteur pour la picrotoxine et la dieldrine (257,273). La même mutation a également été confirmée chez *A. aegypti* (274). Cette mutation a également été identifiée chez *N. lugens* comme apportant une résistance à l'éthiprole (famille des phenylpyrazoles) mais étonnement pas au fipronil (269). De même, la même mutation chez *P. xylostella* ne suffit pas pour conférer une résistance au fipronil (275) suggérant que le mécanisme impliqué dans la résistance contre cette molécule est plus complexe qu'une seule mutation point. Ainsi, il a été montré que les substitutions Ala 302 → Gly et Thr 350 → Met sur RDL confèrent au récepteur une perte de sensibilité légère au fipronil chez *Drosophila simulans* (267) et entraînent une diminution de la sensibilité au fipronil, à la deltaméthrine (famille des pyréthroides) et à l'imidaclopride (famille des néonicotinoides) chez *A. gambiae* (263). De même, la substitution Ala 302 → Asn sur RDL de *Sogatella furcifera* (276) et de *L. striatellus* (277) est associée à une perte de sensibilité au fipronil.

b. Localisation

Chez l'organisme modèle *D. melanogaster*, les sous-unités *rdl* sont largement exprimées dans le système nerveux des stades embryonnaires ainsi que chez l'adulte. Elles sont fortement exprimées dans le cerveau et dans le ganglion thoracique (protocérébrum ventro-lateral) et plus particulièrement dans les lobes optiques, le corps en ellipse, le corps en éventail, et dans les glomérules des lobes antennaires. Le protocerebrum fait partie du ganglion supra-œsophagien et est composé de quatre structures que sont les lobes optiques impliqués dans la vision, la parsintercerebralis impliquée dans des processus neuroendocriniens, le complexe central (dont le corps en ellipse et le corps en éventail font partie) impliqué dans la locomotion et les corps pédonculés impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme le sommeil, la locomotion, l'apprentissage et la mémoire olfactive (278,279). Ainsi, le récepteur RDL est potentiellement impliqué dans chacun de ces processus.

Des études quantitatives de transcrits montrent que *rdl* est principalement exprimé dans le système nerveux de la tête des insectes tels que *Chilo suppressalis* (150) ainsi que dans le thorax et les pattes mais dans une moindre mesure chez *L. striatellus* (280).

c. Fonction

La création de mutants pour de nombreux gènes chez l'organisme modèle *D. melanogaster*, y compris *rdl*, a permis de mettre en évidence certaines de ses fonctions. L'ingestion de substances alimentaires ou non alimentaires est régulée par des neurones GABAergiques exprimant les récepteurs RDL chez la drosophile. Le knockdown du gène *rdl* dans ces neurones conduit la drosophile à une surconsommation d'eau, de sucrose et également de substances non alimentaires par rapport à une drosophile sauvage. A l'inverse, l'activation de ces neurones régule la consommation (281) confirmant le rôle de RDL dans la régulation de la consommation.

L'utilisation de mutants de *rdl* de *D. melanogaster* a également permis de mettre en évidence son implication dans la régulation du sommeil. En effet, *rdl* est exprimée dans les neurones ventro-latéraux impliqués dans l'initiation du sommeil. Cette expression dans ces neurones est favorisée par le gène *wake* qui active l'expression de RDL à la membrane plasmique des neurones, les rendant plus sensibles à un signal GABAergique nécessaire à l'initiation du sommeil (282).

De même, la présence de *rdl* dans les pattes est expliquée par son implication dans la régulation de l'agression entre mâles qui est un processus important pour la sélection sexuelle de *D. melanogaster*. En effet, après un contact physique avec une femelle, les récepteurs *ppk29* exprimés dans les neurones innervant les poils senseurs des pattes captent ce signal et activent une réponse GABAergique activant RDL. L'activation de RDL entraîne une inhibition de l'agressivité du mâle (283).

2. GRD/LCCH3

a. Pharmacologie

Les deux sous-unités *grd* et *lcch3* ont été identifiées dans plusieurs espèces d'insectes mais n'ont été caractérisées au niveau fonctionnel que chez *Apis mellifera* (259), *D. melanogaster* (284) et *Varroa destructor* (271). A l'inverse de *rdl*, ces deux sous-unités ne sont pas capables de former des récepteurs homomériques fonctionnels. En revanche, la combinaison de *grd* et *lcch3* en œufs de xénope conduit à la formation de récepteurs au GABA ayant une sélectivité ionique pour les cations. En effet, le motif PAR du TM2 responsable de la sélectivité anionique retrouvé sur RDL n'est pas présent sur GRD ou LCCH3 (**Figure 23**).

En œufs de xénope, lorsque *rdl* est injecté en combinaison avec soit *grd* soit *lcch3*, les propriétés pharmacologiques des récepteurs hétéromériques sont différentes par rapport au récepteur homomérique RDL. En effet, LCCH3 modifie la sensibilité de RDL au fipronil et à la picrotoxine chez *A. mellifera* (259) et participerait à des fonctions olfactives (285).

b. Localisation et fonction

Chez *C. suppressalis*, le niveau d'expression des transcrits évalué par qRT-PCR a montré que *lcch3* est plus exprimée dans les premiers stades de développement (œufs, L1, L2, L3) et à l'âge adulte qu'aux stades de développement plus avancés (L4, L5, L6, nymphe). De plus *lcch3* est surtout retrouvée au niveau de la tête et du cordon nerveux ventral, mais elle est aussi exprimée dans les intestins (286).

De même, chez *D. melanogaster* et *L. striatellus*, *grd* et *lcch3* sont surtout exprimées dans les stades larvaires et dans les nymphes au niveau de la tête, du ganglion thoracicoabdominal, des yeux, des glandes accessoires mâles et du système nerveux central (280,287). Les expressions préférentielles dans les stades larvaires précoces suggèrent un rôle important dans le développement. De même, la localisation au niveau de la tête et du système nerveux central suggèrent des rôles dans des fonctions motrices et sensorielles.

3. 8916

a. Pharmacologie

La sous-unité 8916 a été identifiée chez *A. mellifera*, *Blattella germanica*, *C. suppressalis*, *D. melanogaster*, *L. striatellus*, *Nasonia vitripennis*, *Periplaneta americana* et *Tribolium castaneum* (216,280,286–288) mais aucunes études fonctionnelles ou pharmacologiques n’ont été réalisées sur cette sous-unité. En se basant sur des analyses phylogénétiques, la sous-unité 8916 est affiliée aux autres sous-unités de récepteurs au GABA RDL, GRD et LCCH3.

b. Localisation

Chez *C. suppressalis*, le niveau d’expression des transcrits évalué par qRT-PCR a montré que 8916 est plus exprimée dans les premiers stades de développement (œufs, L1, L2, L3) qu’aux stades de développement plus avancés (L4, L5, L6, nymphe) et à l’âge adulte. De plus 8916 est surtout retrouvée au niveau du cordon nerveux ventral, mais elle est aussi exprimée dans les intestins et dans la tête (286). Les localisations d’expression de 8916 de *L. striatellus* sont similaires mais présentent des niveaux d’expression très inférieurs par rapport à ceux de *grd* et *lcch3* dans les mêmes tissus (280). En se basant sur les localisations d’expression de cette sous-unité et nos connaissances sur les récepteurs au GABA, nous pouvons spéculer qu’elle a un rôle dans des fonctions motrices et sensorielles ainsi que dans le développement.

F. Sites d'interactions des lactones macrocycliques et des isoxazolines sur leurs cibles pharmacologiques

A ce jour, nos connaissances sur les sites d'interactions des différents antiparasitaires sur leurs cibles restent très limitées. Ce manque de connaissances peut avoir de graves conséquences comme ça a été le cas avec les néonicotinoïdes et les abeilles. Les néonicotinoïdes sont des insecticides utilisés contre les insectes nuisibles pour la protection des cultures. Malheureusement, leur manque de spécificité les rend très actives sur les abeilles qui ne sont pas les cibles voulues de ces produits. Pour éviter ce genre de désastre écologique, il est nécessaire de bien comprendre le mode d'action des antiparasitaires en ayant une vue plus globale de leur impact. Ainsi, la cristallisation de récepteurs ainsi que des études de modélisation par homologie apportent des informations sur les sites d'interaction des antiparasitaires et permettent de mieux comprendre leur mode d'action sur différentes cibles. Ces méthodes permettent également d'orienter les recherches pour identifier de potentiels mécanismes de résistance.

Les GluCl et les récepteurs au GABA sont des cibles pharmacologiques majeures de nombreux antiparasitaires dont certains agissent sur ces deux types de récepteurs. C'est le cas des ML et des isoxazolines qui agissent aussi bien sur les GluCl que sur les GABA_ACl. Les GluCl et les GABA_ACl d'insectes et de nématodes ont des domaines transmembranaires très conservés qui comprennent des sites d'interactions pour les ML et les isoxazolines. De plus, la plupart des acides aminés impliqués dans ses interactions sont partagés entre les GluCl et les GABA_ACl d'invertébrés (**Figure 24**). Cela explique en partie le large spectre d'activité de ces molécules. Aussi, cela illustre la difficulté de développer des molécules spécifiques d'un sous-type de récepteur ou d'une espèce parasite, ainsi que de montrer les difficultés à différencier deux sous-types de récepteurs pharmacologiquement.

```

Cel-GLC-1 : VG-----HQIWMPDTFFPNEKQAYKHTIDKPNVLIIRIHND-GTVLYSVRISLVLSCPMYLQYYPMDVQCCSIDLASYAY : 214
Cel-AVR-14B : TSENADQSQQIWMPDTFFQNEKEARRHLIDKPNVLIIRIHKN-GQILYSVRLSLVLSCPMSLEFYPLDRQNCLIDLASYAY : 193
Cel-GLC-2 : HVK-----KSLWIPDTFFPTEKAAHRHLIDMENMFLRIYPD-GKILYSSRISLTSSCPMRLQLYPLDYQSCNFDLVSYAH : 184
Hco-avr-14B : TSENADQSQQIWMPDTFFQNEKEARRHLIDKPNVLIIRIHKD-GSILYSVRLSLVLSCPMSLEFYPLDRQNCLIDLASYAY : 201
Hco-GLC-2 : HIK-----SNLWIPDTFFPTEKAAHRHLIDTDMFLRIHPD-GKVLYSSRISITSSCHMQLQLYPLDLQFCDFDLVSYAH : 187
Hco-GLC-5 : PG-----QRIWVPDTFFQNEKDGKKHDIDTPNLIIRIHNGTGKILYSCRLTLTLSCPMRLADYPLDVQTCVVDFASYAY : 187
Ame-GluC1 : DA-----SRVWMPDLFFSNEKEGHFHNIIMPVYIRIFPN-GSVLYSIRISLTSCPMNLKLYPLDRQVCSLRMASYGW : 183
Dme-GluC1 : EA-----NRVWMPDLFFSNEKEGHFHNIIMPVYIRIFPN-GSVLYSIRISLTLACPMNLKLYPLDRQICSLRMASYGW : 186
Ame-RDL : -----KNIWVPDTFFVNEKQSYFHIATTSNEFIRIHHS-GSITRSIRLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGY : 193
Dme-RDL : -----KNIWVPDTFFVNEKQSYFHIATTSNEFIRVHHS-GSITRSIRLTITASCPMNLQYFPMDRQLCHIEIESFGY : 208

```

```

                                                    TM1
Cel-GLC-1 : TTKDIEYLWKEHSPLQLKVLGSSSLPSFQLTNTSTTY-CTSVTNTGIYSCLRTTIQLKREFSFYLQLYTPSCLMIVVSW : 293
Cel-AVR-14B : TTQDIKYEWEKKPIQQKDGLRQSLPSFELQDVVTDY-CTSLTNTGEYSCARVVLRRLREYSYLIQLYTPCIMLVVSW : 272
Cel-GLC-2 : TMNDIMYEWDPSTPVQLKPGVGSDDLPNFILKNYTTNADCTSHNTGSYGCLRMQLLFKRQFSYYLVOLYTPTTMIVVSW : 264
Hco-avr-14B : TTQDIKYEWEKQNPVQKDGRLQSLPSFELQDVVTKY-CTSKTNTGEYSCARVKLLRLREYSYLIQLYTPCIMLLVSW : 280
Hco-GLC-2 : TMKDIFYEWDPLAPVQLKPGVGSDDLPNFQLTNIITNDCTSHNTGSYACLRMQLTLKRQFSYYLVOLYGPTTMIVVSW : 267
Hco-GLC-5 : TTKDIEYGWKEEKPIQIKDGLRQSLPSFLLSNVKTCTSVTNTGAYSCLRTIIELKREFSYYLVOLYTPSFMLVAVSW : 266
Ame-GluC1 : TTDDLVLFWKEGDPVQVVKNLH--LPRFTLEKFFTDY-CNSKTNTGEYSCLKVDLLFKREFSYYLIQIYTPCCMLVIVSW : 260
Dme-GluC1 : TTNDLVFLWKEGDPVQVVKNLH--LPRFTLEKFFTDY-CNSKTNTGEYSCLKVDLLFKREFSYYLIQIYTPCCMLVIVSW : 263
Ame-RDL : TMRDIRYKWNEG-PNSVGVSNEVSLPQFKVLGHRQRAMEISLT-TGNYSRLACEIQFVRSMGYYLIQIYTPSGTIVIISW : 271
Dme-RDL : TMRDIRYKWNEG-PNSVGVSSEVSLPQFKVLGHRQRAMEISLT-TGNYSRLACEIQFVRSMGYYLIQIYTPSGTIVIISW : 286

```

```

                TM2                                TM3
Cel-GLC-1 : VSEWFDRTAIPARVTLGVTTLLTMTAQSAGINSLPPVSYIKAIDVWIGACMTFIFCALLEFALVNHIAN-----K : 364
Cel-AVR-14B : VSEWLDKDAVPARVSLGVTTLLTMTTQASGINSLPPVSYIKAVDVWIGVCLAFIFGALLEYAVVNYGR-----K : 343
Cel-GLC-2 : VSEWIDLHSTAGRVALGVTTLLTMTTQASAINAKLPPVSYVKVVDVWLGACQTFVFGALLEYAFVSY----- : 331
Hco-avr-14B : VSEWLDKDAVPARVSLGVTTLLTMTTQASGINSLPPVSYIKAVDVWIGVCLAFIFGALLEYAVVNYGR-----K : 351
Hco-GLC-2 : VSEWIDMHSTAGRVALGVTTLLTMTTQAAINAKLPPVSYVKVVDVWLGACQTFVFGALLEYAFVSY----- : 334
Hco-GLC-5 : VSEWLDKDSVPARVTLGVTTLLTMTTQASGVNANLPPVSYTKAIDIWTGVCLAFIFGALLEFALVNWAAR-----Q : 337
Ame-GluC1 : VSEWLDQSAVPARVSLGVTTLLTMTATQTSGINASLPPVSYTKAIDIWTGVCLTFVFGALLEFALVNYASRS-----DMHS : 335
Dme-GluC1 : VSEWLDQGAVPARVSLGVTTLLTMTATQTSGINASLPPVSYTKAIDIWTGVCLTFVFGALLEFALVNYASRSGSNKANMHK : 343
Ame-RDL : VSEWLNRRNATPARVALGVTTVLMTTLMSSTNAALPKISYVKSIDVYLGTCFVMVFASLLEYATVGYMA----- : 340
Dme-RDL : VSEWLNRRNATPARVALGVTTVLMTTLMSSTNAALPKISYVKSIDVYLGTCFVMVFASLLEYATVGYMA----- : 355

```

Figure 24 : Alignements des domaines transmembranaires 1-3 des GluCl et des GABACl de nématodes et d'insectes avec les sites d'interactions de l'ivermectine et du fluralaner

Les domaines transmembranaires sont surlignés en gris. Les domaines cys-loop sont surlignés en rose. Les acides aminés impliqués dans l'interaction à l'ivermectine sont surlignés en vert. Les acides aminés impliqués dans l'interaction au fluralaner sont surlignés en violet. Les acides aminés impliqués dans les interactions à l'ivermectine et au fluralaner sont surlignés en rouge.

1. Lactones macrocycliques

Pour les GluCl_s, la sous-unité GLC-1 de *C. elegans* a été cristallographiée avec de l'ivermectine et du glutamate, permettant de révéler ses domaines de liaisons (204). Le glutamate se fixe dans la partie extracellulaire des sous-unités, au niveau de la cys-loop (**Figure 15, Figure 16, Figure 25, Figure 26A**).

L'ivermectine, quant à elle, est enchâssée dans la membrane au niveau des domaines transmembranaires. La **Figure 26B** représente la structure chimique de l'ivermectine avec les sites de liaison au récepteur. L'ivermectine est à l'interface entre deux sous-unités et se lie au TM3 de la sous-unité principale et au TM1 de la sous-unité complémentaire par des interactions hydrophobes et hydrogènes. Elle est profondément enchassée dans le récepteur et interagit même avec le TM2 de la sous-unité principale qui compose le canal ionique (**Figure 26, C, D**). Les acides aminés impliqués sont L278, Q280, I283, N325, M345, T346 et F349. Connaissant son mode d'action d'activateur irréversible des GluCl_s, il est possible que l'interaction de l'ivermectine avec le TM2 augmente l'affinité du récepteur pour le glutamate et le stabilise dans sa conformation ouverte.

La cristallographie de Cel-GLC-1 a également été réalisée avec la picrotoxine qui est connue comme étant un bloquer de canaux (open channel blocker). Cela est vérifié car la picrotoxine est localisé à l'intérieur du canal au niveau de la partie cytosolique. Pour que la picrotoxine rentre dans le canal pour effectuer son action de bloqueur, le canal doit être ouvert. L'état conformationnel du récepteur en présence de picrotoxine ou d'ivermectine ne change pas, ce qui supporte l'idée que l'ivermectine, une fois enchâssée dans la membrane, maintient le canal dans une conformation ouverte (**Figure 27**).

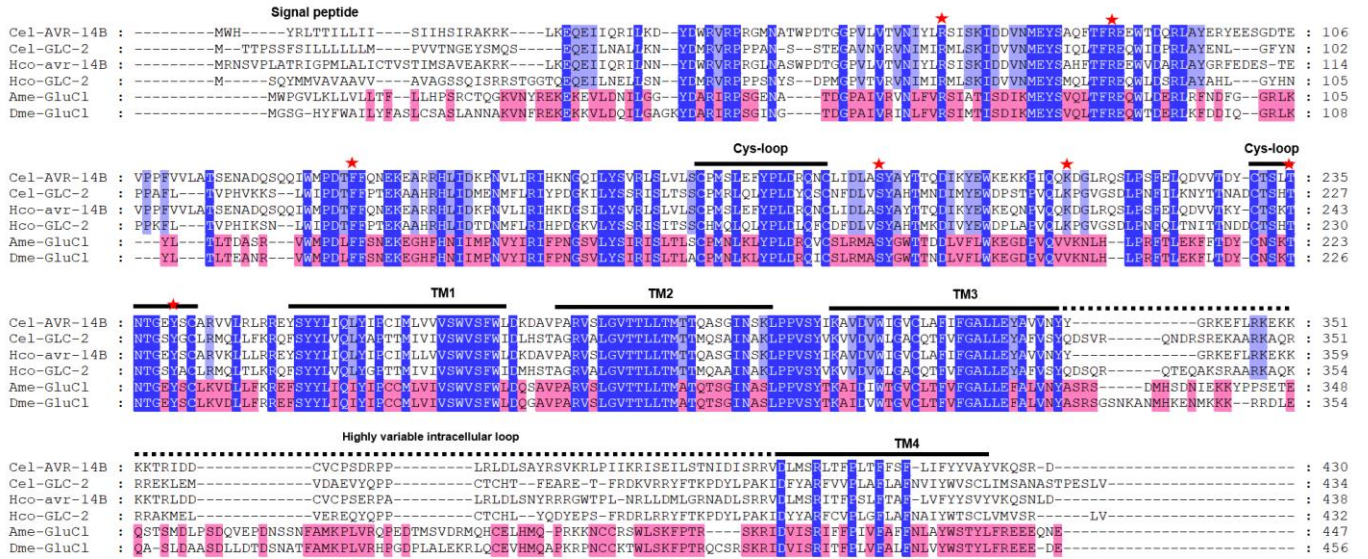


Figure 25 : Alignement de séquences protéiques de GluCl1 des nématodes *C. elegans* (Cel) et *H. contortus* (Hco) et des insectes *A. mellifera* (Ame) et *D. melanogaster* (Dme).

Les domaines transmembranaires, les domaines cys-loop et la partie intracellulaire hypervariable sont indiqués par des barres noires au dessus des séquences. Les acides aminés communs entre toutes les séquences sont surlignés en bleu foncés. Les acides aminés communs entre les GluCl1 de nématodes sont surlignés en bleu clair tandis que les acides aminés communs entre les GluCl1 d'insectes sont surlignés en rose. Les acides aminés impliqués dans la liaison au glutamate sont indiqués avec des étoiles rouges au dessus des séquences.

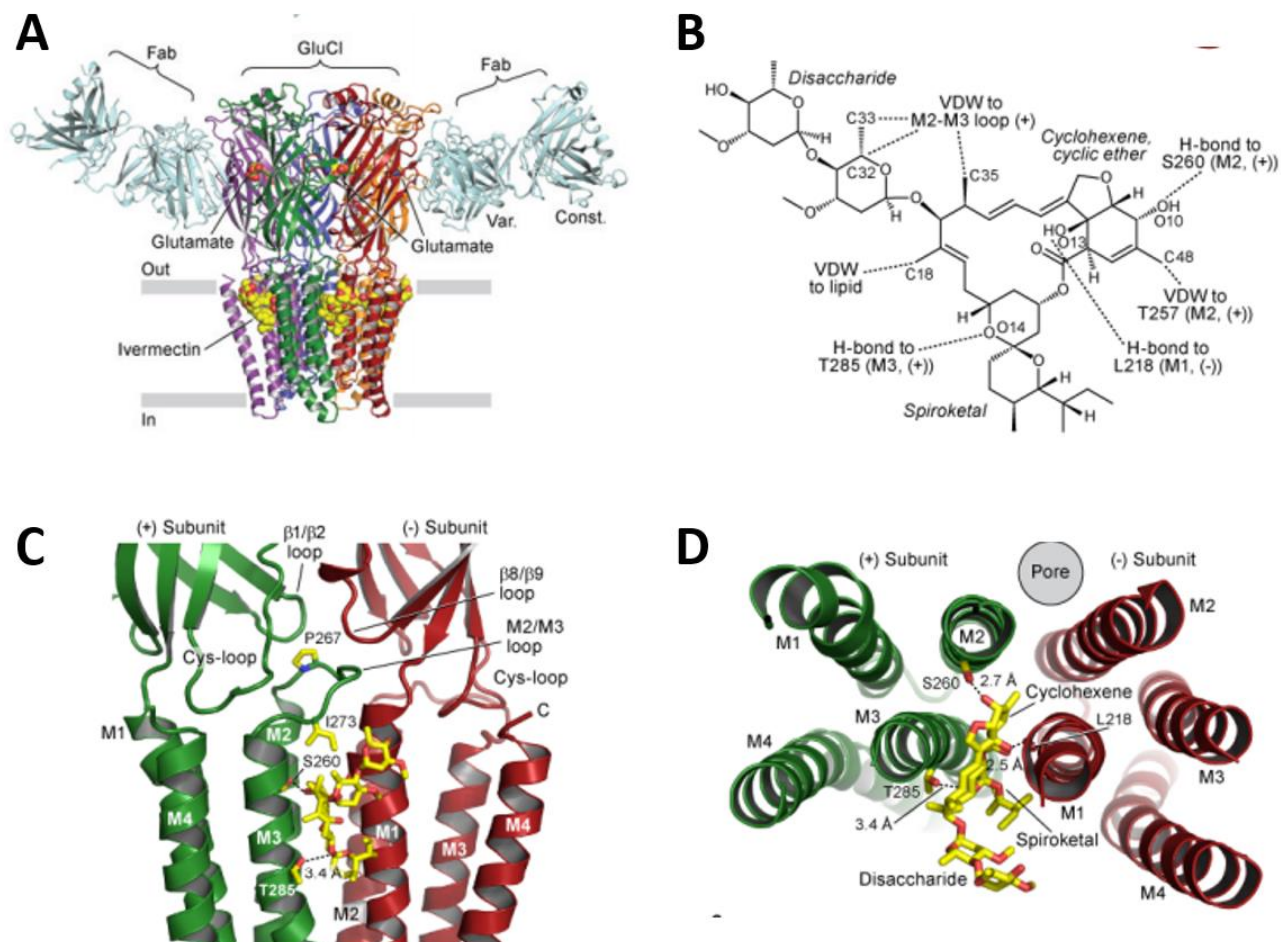


Figure 26 : Sites d'interactions du glutamate et de l'ivermectine sur GLC-1 de *C. elegans* (adaptée de Hibbs et Gouaux, 2011 (204))

- Représentation générale du récepteur avec les localisations du glutamate (en orange, dans la partie extracellulaire) et de l'ivermectine (en jaune, enchâssée dans la membrane au niveau des domaines transmembranaires). Deux des anticorps (FAB) utilisés pour la cristallographie sont également indiqués.
- Structure chimique de l'ivermectine avec les sites d'interactions au récepteurs indiqués (VDW = van der Waals).
- C-D Représentations des sites de liaison de l'ivermectine sur le récepteur.

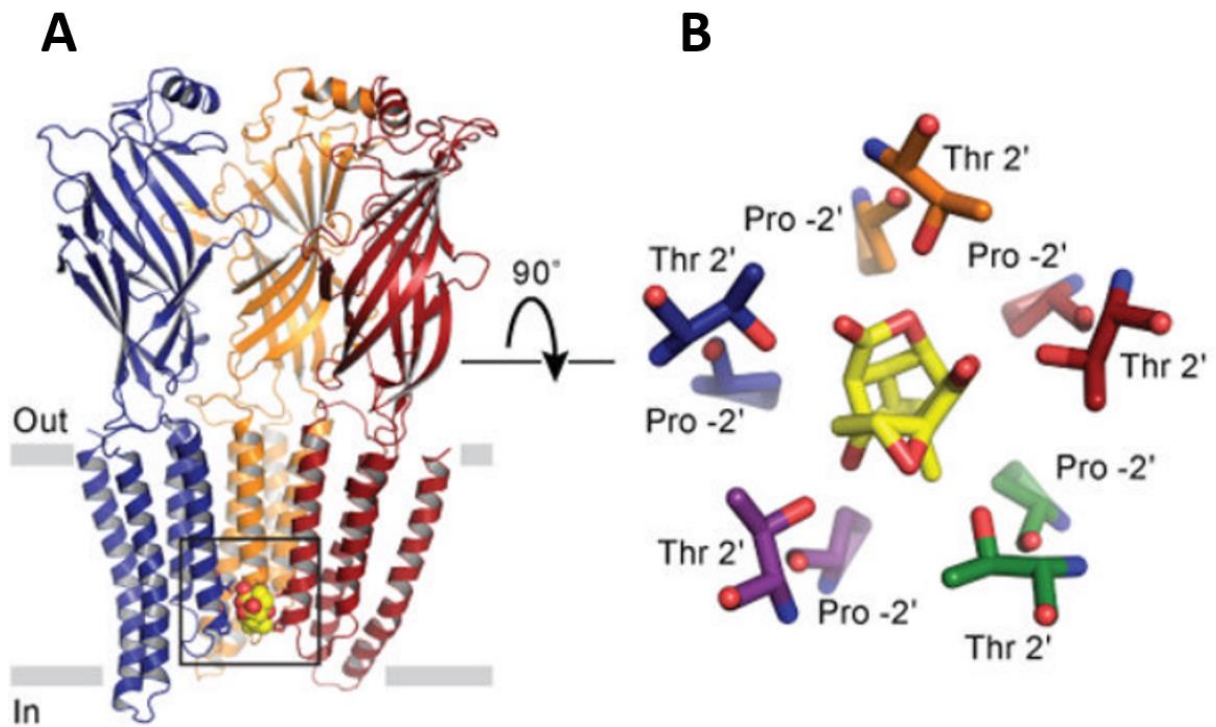


Figure 27 : Site de liaison de la picrotoxine sur GLC-1 de *C. elegans* (adaptée de Hibbs et Gouaux, 2011 (204))

A-B. Représentation des sites d'interactions de la picrotoxine sur Cel-GLC-1. La picrotoxine est localisée à l'intérieur du canal formé par les TM2 de chaque sous-unités formant le récepteur.

2. Isoxazolines

Les isoxazolines étant une famille de molécules développées plus récemment que les lactones macrocycliques, les données concernant leur sites d'interactions sont moins connus. Cependant, certaines études apportent quelques informations sur les acides aminés importants pour la sensibilité des récepteurs aux isoxazolines.

Des acides aminés impliqués dans l'effet du fluralaner sur RDL et GluCl de *M. domestica* ont été identifiés à la suite d'études de modélisation par homologie en se basant sur la structure cristallographique de GLC-1 de *C. elegans*. Bien que la sous-unité utilisée comme modèle appartiennent à une autre espèce, un certain nombre d'acides aminés ont été prédit comme étant impliqués dans les effets du fluralaner sur RDL et GluCl de *M. domestica*. De plus, des études fonctionnelles et pharmacologiques par TEVC ont permis de confirmer l'impact de chacun des sites identifiés sur leur apport dans la sensibilité au fluralaner. Les acides aminés correspondants sont Q271, I274, L278, A299, D329, G333 et F336 pour RDL, dont les plus importants pour la modulation de l'effet du fluralaner sont Q271 ; I274, L278 et G333 (289). Ces acides aminés sont localisés au niveau des domaines transmembranaires 1, 2 et 3 qui sont des domaines très conservés sur les récepteurs à cys-loop des invertébrés (**Figure 24, Figure 28**). Cela explique pourquoi le fluralaner a également une activité d'antagoniste sur le récepteur GluCl de *M. domestica* (198). Ces études de modélisation, couplées au mode d'action d'antagoniste non compétitif sur le récepteur RDL de *D. melanogaster* (187) suggèrent que les isoxazolines ont également une fonction de modulateurs allostériques négatifs.

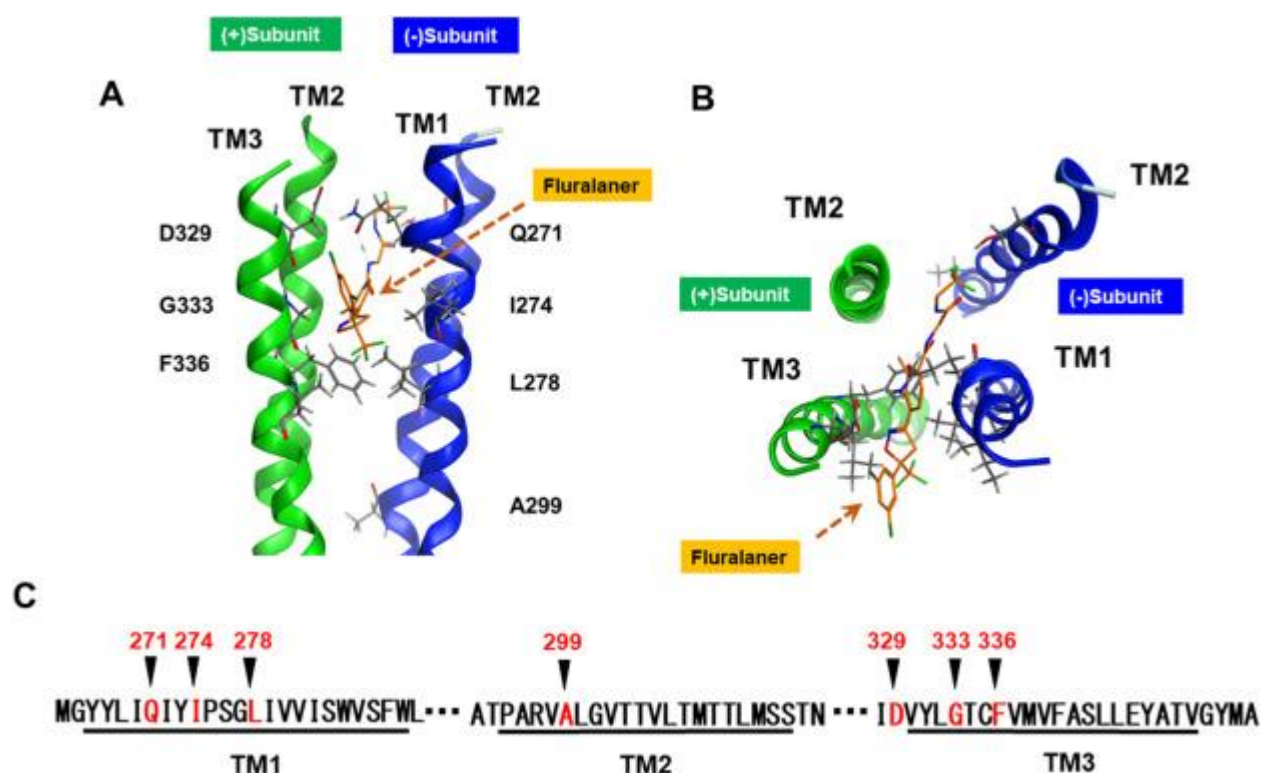


Figure 28 : Acides aminés impliqués dans la sensibilité au fluralaner sur RDL de *Musca domestica* (adaptée de Yamato et al, 2020 (289))

A-B. Représentation de l'interaction du fluralaner avec deux sous-unité RDL adjacentes.

C. Séquences protéiques des domaines transmembranaires 1, 2 et 3 de Mdo-RDL dont les acides aminés impliqués dans la sensibilité au fluralaner sont indiqués en rouge.

V.Projet de thèse

Les lactones macrocycliques (MLs) sont des molécules à large spectre d'activité aux propriétés insecticides, acaricides et nématocides. Elles sont représentées par une large gamme de molécules massivement utilisées contre les endo- et les ectoparasites d'humains, d'animaux et même de plantes. Les cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques chez les invertébrés sont principalement les GluCl et les récepteurs ionotropes au GABA dans une moindre mesure. Cependant, les cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques, leur mode d'action et les mécanismes associés à la résistance restent largement méconnus chez un grand nombre de parasites ayant un impact majeur en santé humaine et animale. Les nématodes et les insectes n'ont que quelques gènes codant pour des GluCl et des récepteurs au GABA bien qu'il existe une grande diversité de récepteurs grâce à différents mécanismes moléculaires. Identifier les cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques est une étape nécessaire pour améliorer nos connaissances sur leur mode d'action et ainsi pouvoir améliorer le contrôle du parasitisme, notamment dans le cas d'émergence de parasites résistants. De plus, l'identification et la validation de nouvelles cibles pharmacologiques permettront le développement de nouveaux composés qui participeront à l'amélioration des stratégies thérapeutiques actuelles.

Le but de mon projet de thèse était d'identifier et de caractériser les cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques chez des espèces pathogènes d'invertébrés afin de mieux comprendre leur mode d'action en tant qu'anthelminthiques et insecticides.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à étudier plusieurs espèces de parasites invertébrés impactant la santé humaine et animale. Pour les nématodes, trois espèces ont été utilisées incluant le nématode parasite filaire humain *Brugia malayi* (clade V), le nématode parasite des équins *Parascaris univalens* (clade III) et le nématode modèle libre *Caenorhabditis elegans* (clade V). La variété d'hôte et de clade des nématodes utilisés a permis de mettre en évidence des similitudes et des différences existantes entre les nématodes libres et parasites concernant leurs cibles pharmacologiques aux MLs. Pour les insectes, l'espèce utilisée est le pou de corps humain *Pediculus humanus humanus* dont la prévalence mondiale en fait un enjeu de santé publique.

La **première étape de ma thèse était d'identifier différentes sous-unités de LGICs dans chacune des espèces cibles**. Pour se faire, nous avons utilisé une approche gène-candidat en s'appuyant sur les connaissances acquises des GluCl et des récepteurs au GABA chez les organismes modèles *C. elegans* et *D. melanogaster* qui sont connues pour être des cibles des MLs. Des BLAST dans les bases de données génomiques et transcriptomiques de *B. malayi*, *P. univalens* et *P. humanus* ont permis d'identifier des séquences partielles de plusieurs GluCl et récepteurs au GABA. Des RACE-PCR ont été réalisées pour identifier la séquence codante complète de chaque sous-unité pour pouvoir synthétiser *in vitro* chacun des ARNc correspondants à chaque sous-unité.

La deuxième étape était de trouver la bonne composition en sous-unités permettant la formation de récepteurs fonctionnels afin d'explorer la diversité potentielle des cibles des lactones macrocycliques chez les nématodes et les insectes. La fonctionnalité des sous-unités a été étudiée dans un premier temps en injectant les ARNc des sous-unités seules ou en combinaison en œufs de *Xenopus laevis* puis en réalisant des mesures d'électrophysiologies par la technique de voltage-clamp en double électrodes (TEVC).

A la grande diversité de récepteurs s'ajoute la grande diversité de lactones macrocycliques dont le mode d'action reste flou chez de nombreux invertébrés. La troisième étape de ma thèse était d'évaluer l'efficacité des lactones macrocycliques et de caractériser leurs propriétés pharmacologiques sur chaque cible identifiée par électrophysiologie en œufs de *X. laevis*.

Parmi les sous-unités de GluClIs identifiées, la sous-unité *glc-5* n'a été retrouvée que chez *P. univalens* et *H. contortus* ce qui en fait une cible très intéressante. La quatrième étape de ma thèse était de mieux caractériser cette sous-unité en étudiant sa localisation et son implication dans la sensibilité aux lactones macrocycliques en utilisant le nématode modèle *C. elegans* comme système d'expression hétérologue.

Enfin, chez le pou, la dernière étape de ma thèse était d'étudier l'effet pédiculicide de différentes molécules *in vivo* sur des adultes et des lentes de poux de corps *Pediculus humanus humanus* pour trouver un nouveau composé pédiculicide.

Ce projet de thèse a permis de développer trois axes de recherches qui feront l'objet de trois publications :

➔ **Functional investigation of conserved glutamate receptor subunits reveals a new mode of action of macrocyclic lactones in nematodes**

Soumission à British Journal of Pharmacology

Première version avant peer-reviewing accessible sur BioRxiv (doi.org/10.1101/2020.12.17.423223)

- ❖ Explorer la diversité des cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques et trouver la bonne composition en sous-unités nécessaires à la formation de récepteurs fonctionnels en œufs de *X. laevis* en s'appuyant sur les sous-unités homologues (AVR-14, GLC-2, GLC-3 et GLC-4) retrouvées chez les trois nématodes d'intérêt : *C. elegans*, *B. malayi* et *P. univalens*.
- ❖ Caractériser pharmacologiquement les récepteurs identifiés afin d'élucider le mode d'action des lactones macrocycliques en utilisant le modèle d'expression hétérologue œuf de *Xenopus laevis*. Comparaison des similitudes et différences de fonctionnalités des récepteurs et de leur pharmacologie en fonction de l'espèce de nématode.

➔ **Molecular and functional characterisation of a glutamate-gated chloride channel found in parasitic nematodes *Parascaris univalens* and *Haemonchus contortus***

En cours d'écriture pour soumission à PLoS Pathogens

- ❖ Caractériser une cible pharmacologique spécifiquement retrouvée chez les nématodes parasites *Parascaris sp.* et *Haemonchus contortus* (GLC-5) par électrophysiologie en œufs de *Xenopus laevis*.
- ❖ Etudier sa localisation et confirmer son rôle dans la sensibilité aux lactones macrocycliques *in vivo* en utilisant le nématode modèle *C. elegans* comme système d'expression hétérologue.
- ❖ Identifier les sites de liaison du glutamate, de l'iboténate et de l'ivermectine sur le récepteur par modélisation pour comprendre son mode d'action.

➔ **The molecular targets of ivermectin and lotilaner in the human louse *Pediculus humanus humanus* – new prospects for the treatment of pediculosis**

Publication dans PLoS Pathogens le 18/02/2021 ([10.1371/journal.ppat.1008863](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008863))

Première version avant peer-reviewing accessible sur BioRxiv (doi.org/10.1101/2020.08.06.239400)

- ❖ Identifier de nouvelles molécules aux effets pédiculicides par des tests de toxicité sur les adultes et les lentes de poux de corps *Pediculus humanus humanus*
- ❖ Identifier et caractériser les cibles moléculaires (GluCl et RDL) des molécules candidates (ivermectine et lotilaner) par électrophysiologie en œufs de xénope.
- ❖ Caractériser le type d'antagonisme de l'ivermectine et du lotilaner sur le récepteur au GABA RDL

MATERIELS ET METHODES

I. Réactifs et Milieux

A. Réactifs et milieux pour biologie moléculaire

- ❖ **Ampicilline** (100 mg/mL) : 1 g d'ampicilline sodium salt (Sigma Aldrich) est dissous dans 10 mL d'eau milliQ en vortexant. La solution est filtrée via un filtre de cellulose de 0,2 µm avec une seringue. La solution est aliquotée dans des tubes eppendorf de 1,5 mL.
- ❖ **Gel d'agarose** : 0,8 – 2% d'agarose est mélangé à du TAE 1X (dilué avec de l'eau déminéralisée). Le mix est chauffé au micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Après avoir refroidi 5-10 min sur la paillasse, le mix est coulé dans le portoir approprié avec du bromure d'éthidium (BET) à 5 µg/mL.
- ❖ **Marqueur de taille** : Smart Ladder MW 1700-02, 200 – 10.000 pb (Eurogentec)
- ❖ **Milieu Luria-bertani (LB) liquide** : capsules contenant 10 g de tryptone, 10 g de NaCl et 5 g d'extrait de levure (MP Biomedical) sont ajoutées à 1 L d'eau milliQ puis stérilisées à l'autoclave.
- ❖ **Milieu LB gélosé** : capsules contenant 10 g de tryptone, 10 g de NaCl, 15 g d'agar et 5 g d'extrait de levure (MP Biomedical) sont ajoutées à 1 L d'eau milliQ puis stérilisées à l'autoclave.
- ❖ **PBS** (Phosphate Buffered saline) 1X : une pastille est diluée dans 200 mL d'eau milliQ
- ❖ **Tampon TAE 50X** (Tris, Acétate, EDTA) : Tris base 242 g de Na₂EDTA.2H₂O avec 57,1 mL d'acide acétique (sous hotte) sont mélangés avec le volume ajusté avec de l'eau milliQ à 1 L.

B. Réactifs et milieux pour électrophysiologie

- ❖ **Solution d'incubation** : NaCl 100 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), Na pyruvate 2,5 mM, pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, pH 7,5 équilibrée avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH). La solution est filtrée avec un filtre de cellulose de 0,22 µm puis est stockée à 4°C.
- ❖ **Solution de Ringer** ou solution d'enregistrement : NaCl 100 mM, KCl 2,5 mM, CaCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,3 équilibré avec NaOH. La solution est préparée en 8X et stockée à 4°C puis diluée à 1X dans de l'eau milliQ pour utilisation.
- ❖ **Solution de Ringer modifiée sans sodium ni potassium** : le NaCl et le KCl de la solution de Ringer sont remplacés par du Tétrahéthylammonium chloride (TAECl). La solution est alors composée de TAECl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 5 mM, pH 7,2 équilibré avec TEAOH.
- ❖ **Solution de Ringer modifiée sans chlore** : le chlore (Cl⁻) est remplacé par de l'acétate de sodium (NaAcétate). La solution est alors composée de NaAcétate 100 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 5 mM, pH 7,2 équilibré avec NaOH.

C. Réactifs et milieux pour la culture de *C. elegans*

- ❖ **Milieu M9** : 3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl , 1 ml de MgSO_4 1 M complété à 1 L avec de l'eau milliQ. Le milieu est stérilisé par autoclavage avant utilisation.
- ❖ **Milieu M9 + BSA** : du BSA (Bovine Serum Albumin) à 0,1 % final est ajouté au milieu M9 après l'autoclavage.
- ❖ **NGM (Nematode Growth Medium)** : 3 g NaCl (51 mM final), 2 g de bactopeptone et 17 g d'agar (1,7 % final) complété avec 975 mL d'eau milliQ pour un volume final de 1 L. Le milieu est stérilisé par autoclavage. Au moment de couler le milieu dans des boîtes de pétri, le milieu est maintenu à 55°C le temps de l'enrichir avec 1 mL de CaCl_2 1 M (1 mM final), 1 mL de cholestérol à 5 mg/mL dans de l'éthanol (+/- 13 μM final), 1 mL MgSO_4 1 M (1 mM final) et 25 mL de KPO_4 pH 6 1 M (25 mM final).

II. Collecte des nématodes

A. *Brugia malayi*

Les microfilaires de *Brugia malayi* ont généreusement été fournies par le groupe d'Adrian Wolstenholme (Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA, 30602, USA) et par le NIH/NIAID Filariasis Research Reagent Resource Center, University of Georgia, Athens, GA, USA (www.filariasiscenter.org). Les microfilaires sont conservées à -80°C dans du RNA later (Ambion) jusqu'à utilisation.

B. *Parascaris sp.*

Différents stades de *P. univalens* ont été récoltés dans les fèces de poulains naturellement infestés de l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfasière (UEPAO, INRA Centre Val de Loire, Nouzilly, 37380, France). Les vers ont été récoltés dans les fèces des poulains 50 h après avoir pris un traitement à base d'ivermectine. Les vers ont été lavés à l'eau puis découpés en trois parties : la tête comprenant le pharynx, le corps et 2 cm de queue. Les corps ont été découpés en plusieurs morceaux de plus ou moins 2 cm. Les échantillons sont conservés à -80°C dans du RNA later jusqu'à utilisation.

C. Caenorhabditis elegans

Plusieurs souches de vers *C. elegans* ont été utilisées dans ces études. La souche sauvage Bristol N2 et le triple mutant résistant à l'ivermectine DA1316 (*avr-14, avr-15, glc-1*) ont été fournis par le *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) qui est financé par le NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). Le quadruple mutant résistant à l'ivermectine JD369 (*avr-14, avr-15, glc-1, glc-3*) a généreusement été donné par le Pr. Joseph Dent (Département de Biologie, Université de McGill, Montréal, Québec).

D. Pediculus humanus humanus

La colonie de poux de corps humain *Pediculus humanus humanus* est entretenue par l'équipe BioMédicaments AntiParasitaires (BioMAP, Université de Tours, France) et a été fournie par Kosta Y. Mumcuoglu du Kuvim Center for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel. Ces poux de corps sont issus d'une souche humaine adaptée à se nourrir avec du sang de lapin 4 fois par semaine (autorisation par le Ministère de la Recherche française :APAFIS#8455-2017010616224913 v3). Ils sont cultivés dans des bocaux contenant plusieurs couches de tissus à l'intérieur d'une étuve dont la température (30 +/- 1°C) et l'hygrométrie (60-70%) sont contrôlées (290). Cette souche de poux n'a jamais été en contact avec des drogues et en fait donc une souche pertinente pour étudier l'effet de molécules sur leur physiologie.

III. Analyses de séquences

Les génomes de *C. elegans*, de *B. malayi*, de *Parascaris sp.* et de *P. humanus humanus* ont été entièrement séquencés. Les séquences codantes des sous-unités d'intérêts ont été identifiées à l'aide de recherches bioinformatiques dans les bases de données génomiques de NCBI en utilisant le programme Basic Local Alignment Tool (BLAST : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Des analyses complémentaires sont réalisées dans les bases de données du Sanger Institute (<https://www.sanger.ac.uk/action/BLAST/>), de WormBase (https://wormbase.org/tools/blast_blat) et de WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/Tools/Blast?db=core>). Les séquences d'intérêts (GluCl, GABACl, promoteurs etc...) de *C. elegans* et de *B. malayi* ont pu être identifiées en entier à partir de ces analyses. En revanche, pour *Parascaris sp.* et *P. humanus humanus*, les séquences obtenues à la suite des BLAST n'étaient que partielles avec les parties 5' et 3' manquantes.

Les séquences nucléotidiques et protéiques sont manipulées avec The Sequence Manipulation Suite (<https://www.bioinformatics.org/sms/>). Les sites de coupures pour les enzymes de restrictions sont déduits avec NEBcutter (<http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/>). Les peptides signaux sont prédits avec SignalP4.1 et/ou SignalP5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Les domaines transmembranaires sont prédits avec Simple Modular Architecture Research Tool (SMART : <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Les pourcentages d'identité et de similarité entre deux séquences protéiques matures sans peptides signaux sont obtenus avec EBI Global Alignment EMBOSS Needle (291).

Les séquences nucléotidiques et protéiques sont alignées et annotées avec GENEDOC (IUBio).

IV. Phylogénie

Des arbres de distances (Neighbour Joining, Poisson) sont construits avec SeaView en utilisant la méthode de distance BioNJ (292). Les valeurs de bootstraps sont calculées sur 1000 répliques d'arbres. Les arbres sont mis en forme avec FigTree. Les séquences utilisées pour les BLAST et les constructions d'arbres sont disponibles sur Genbank sous les numéros d'accèsion suivant :

- ❖ *Anopheles gambiae* (Aga), GluCl AGS43089.1
- ❖ *Apis mellifera* (Ame): GluCl ABG75737, GRD AJE68942, LCCH3 AJE68943, RDL AJE68941, CG8916 NP_001071290; nAChR- α 7 AJE70265
- ❖ *Brugia malayi* (Bma) : AVR-14B (MW196269), GLC-2 (MW196266), GLC-3 (MW196267), GLC-4 (MW196268)
- ❖ *Caenorhabditis elegans* (Cel) : AVR-14A (AAC25481), AVR-14B (MW196270), AVR-15A (CAA04171), AVR-15B (CAA04170), GLC-1 (AAA50785), GLC-2 (AAA50786), GLC-3 (CAB51708), GLC-4 (NP_495489.2), UNC-49B1 (AAD42383)
- ❖ *Canis lupus* (Clu) : GABRA-1 (ATV93513.1), GABRB-2 (ATV93514.1), GABRG-2 (ATV93515.1)
- ❖ *Cooperia oncophora* (Con), AVR-14B CBM40945.1, GLC-2 AAR21856.1, GLC-4 CCN97894.1
- ❖ *Ctenocephalides felis* (Cfe): RDL AHE41088
- ❖ *Cylicocyclus nassatus* (Cna), GLC-2 AAU95604.1, GLC-3 AAU95605.1
- ❖ *Drosophila melanogaster* (Dme): GluCl AAC47266, GRD NP_524131, LCCH3 NP_996469, RDL NP_523991, CG8916 NP_001162770
- ❖ *Haemonchus contortus* (Hco) : AVR-14A CAA74622, AVR-14B CAA74623, GLC-2 CAA70929, GLC-4 ABV68894, GLC-5 AAD13405, UNC-49B (ACL14329.1), UNC-49C (ABW22635.1)
- ❖ *Homo sapiens* (Hsa) : nAChR- α 7 (NP_001177384.1), GABRA-1 (NP_000797.2), GABRA-2 (AAB27278.1), GABRA-3 (AAB27279.1), GABRA-4 (AAB52519.1), GABRA-5 (AAB22608.1), GABRB-2 (NP_001358656.1), GABRB-3 (AAA52511.1), GABRG-2 (NP_944494.1), GABRG-3 (AAF99698.1)
- ❖ *Ixodes scapularis* (Isc): GluCl ALF36853
- ❖ *Laodelphax striatellus* (Lst), GluCl AEE39458.1
- ❖ *Musca domestica* (Mdo): GluCl BAD16657, RDL NP_001292048
- ❖ *Parascaris univalens* (Pun): AVR-14B MW187941, GLC-2 MW187938, GLC-3 MW187939, GLC-4 MW187940, GLC-5 QBZ81966
- ❖ *Pediculus humanus humanus* (Phh): GluCl1 MT321070, GluCl2 MT321071, RDL1 MT321072, RDL2 MT321073
- ❖ *Plutella xylostella* (Pxy) : GluCl NP_001292447.1
- ❖ *Rhipicephalus microplus* (Rmi): GluCl AHE41097, RDL AHE41094
- ❖ *Tetranychus urticae* (Tur): GluCl BAJ41378

- ❖ *Tribolium castaneum* (Tca): GluCl NP_001107775, GRD NP_001107772, LCCH3 NP_001103251, RDL NP_001107809, 8916 NP_001103425
- ❖ *Homo sapiens* (Hsa), GLRA1 NP_000162.2, GLRA2 NP_001112357.1, GLRA3 NP_001036008.1, GLRB NP_000815.1

Les séquences issues du BLAST de GLC-5 sont disponibles sur WormBase Parasite sous les numéros d'accès suivant :

- ❖ *Ancylostoma ceylanicum* (Ace) : GLC-5 Acey_s0247.g67
- ❖ *Ascaris suum* (Asu) : GLC-5 AgR031X_g061
- ❖ *Diploscapter coronatus* (Dco) : GLC-5 DCO010990
- ❖ *Diploscapter pachys* (Dpa) : GLC-5 WR25_08136
- ❖ *Halicephalobus mephisto* (Hme) : GLC-5 MSTRG.3695
- ❖ *Heligmosomoides polygyrus* (Hpo) : GLC-5 HPOL_0000036801
- ❖ *Panagrellus redivivus* (Pre) : GLC-5 Pan_g9427
- ❖ *Parapristionchus giblindavisi* (Pgi) : GLC-5 Parapristionchus-mkr-S_19-1.52-mRNA-1
- ❖ *Plectus sambesii* (Psa) : GLC-5 PSAMB.scaffold3393size18464.g21349
- ❖ *Steinermia carpocapsae* (Sca) :GLC-5 L596_009315
- ❖ *Steinermia feltia* (Sfe) : GLC-5 L889_g631
- ❖ *Steinermia scapterisci* (Ssc) : GLC-5 L892_g28237

V. Méthodes de biologie moléculaire

A. Extraction d'ARN

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'un groupe d'adultes de *C. elegans*, à partir de plusieurs microfilaires pour *B. malayi* et à partir d'une quinzaine de poux adultes pour *Pediculus humanus humanus* (10-15 poux soit 20-30 mg de tissus) dans la glace. Les échantillons sont placés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL et broyés mécaniquement avec un piston adapté (Dutscher) dans du tampon RA1 du kit d'extraction d'ARN « Total RNA Isolation Nucleospin RNA » (Macherey Nagel) suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN sont élués dans de l'eau sans RNase.

Pour *Parascaris sp.*, les ARN totaux ont été extraits d'une tête d'un ver adulte contenant le pharynx. La tête est broyée avec un mixeur électrique dans des tubes de 5 mL avec du Trizol (Trizol reagent, Invitrogen) dans la glace et sous une hotte à flux laminaire. La mixture obtenue est ensuite passée plusieurs fois dans des aiguilles de diamètres de plus en plus petits (0,8 µm, 0,45 µm et 0,3 µm) pour casser mécaniquement les amas cellulaires. Du chloroforme est ajouté (0,2 mL/mL de Trizol reagent) et l'ensemble est transféré dans un tube Phase lock Gel Heavy permettant la séparation des phases aqueuses et organiques. Une centrifugation de 15 min à 12 000 g à 4°C permet de récupérer la phase aqueuse contenant les ARN. Les ARN sont précipités avec de l'isopropanol (100%) puis lavés avec de l'éthanol 75 % avant d'être dissouts dans de l'eau sans RNases.

B. Rétrotranscription des ARNm

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) des nématodes est réalisée à partir du kit Maxima H minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) en suivant les recommandations du fournisseur. Une première réaction contenant 0,5 à 5 µg d'ARN, des dNTPs (0,5 mM pour chaque) et un oligo(dt)18 (1,5 µM final) complété avec un volume d'eau approprié (qsp 14,5 µL), est mise à incuber 5 min à 65°C pour fixer les oligo(dt)18 sur les ARNm puis est placée dans la glace. Le tampon RT Buffer (1X), un inhibiteur de RNase (20 u) et la retrotranscriptase (200 u) sont ajoutés avant d'être mis en incubation 1h30 à 50°C. La rétrotranscriptase est inactivée en chauffant le mélange 5 min à 85°C.

La rétrotranscription des ARN totaux de *P. humanus humanus* est réalisée selon les recommandations du fournisseur du kit « GeneRacer™ kit with SuperScript™ III RT and TOPO TA Cloning™ kit for Sequencing » (Invitrogen). Ce kit permet de ne rétrotranscrire et de ne sélectionner que les ARNm pleine longueur en éliminant toutes les formes tronquées et immatures très présentes chez les insectes. De plus, le kit permet de rajouter des séquences connues en 5' et en 3' nécessaires pour la réalisation de 5' et 3' RACE PCR nichées (rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction). Jusqu'à 5 µg d'ARN sont rétrotranscrits selon les recommandations du kit (dNTPs à 0,5 mM pour chaque, oligodT 1,5 µM, First strand buffer 1X, DTT 0,5 mM (dithiothréitol), RNase Out 40 u, SuperScript II Rétrotranscriptase 200 u, complété à 20 µL avec de l'eau). La réaction est inactivée en chauffant 5 min à 70°C et les ARN restant sont éliminés en ajoutant de la RNase H à 2 u, pour ne garder que les ADNc. Les ADNc sont conservés à -20°C et placés dans la glace avant utilisation.

C. Préparation des constructions plasmidiques

Plusieurs polymérases ont été utilisées suivant la séquence à amplifier et le niveau de fidélité d'amplification voulu (TaqPolymérase et Phusion Polymérase, **Tableau 7**). Le profil des produits de PCR est vérifié après une migration de 30 à 45 min sur gel d'agarose 1 % avec du BET à 100 mV. Le marqueur de taille utilisé est le Smart Ladder MW1700-02 marquant de 200 à 10.000 pb (Eurogentec). Les bandes d'intérêts ou les produits de PCR avant migration sont extraits avec le kit Gel and PCR Clean Up (Macherey Nagel). Après élution, les ADN d'intérêts sont dosés au nanodrop (Nanodrop One, Ozyme) et conservés dans la glace ou à -20°C avant utilisation.

1. 5' et 3' RACE PCR nichées

Les PCR nichées se font en deux réactions de PCR successives qui permettent d'augmenter la spécificité d'une réaction. Les réactions de RACE-PCR sont réalisées avec des Taq polymérases provenant de deux fournisseurs différents : TaqDNA polymérase (Euromedex, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,25 mM, amorces 0,4 µM, TaqDNA polymérase et tampon 1X) et GoTaq (GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix, Promega, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, amorces 0,5 µM, GoTaq polymérase et tampon 1X, pH 8,5). Les deux polymérases rajoutent une adénine nécessaire pour le clonage des produits de PCR dans les vecteurs pGEM-T (**Annexe 1**) ou pCR-4 (**Annexe 2**). Pour les séquences des sous-unités codantes les GluCl et les GABACl de *Parascaris sp.* et de *P. humanus humanus*, les parties en 5' et en 3' n'ont pas pu être identifiées à la suite de recherche bioinformatiques dans les bases de données génomiques et transcriptomiques. Par conséquent, des RACE PCR nichées ont été réalisées pour identifier les extrémités manquantes à l'aide de deux couples d'amorces. Pour les 5' RACE PCR, le premier couple est défini avec l'amorce antisens dans une région spécifique de la séquence codante tandis que l'amorce sens est définie soit dans la séquence SL1 (Splice Leader 1 qui est présente en 5' avant le codon d'initiation de la traduction de nombreux gènes chez les nématodes) (293) pour *Parascaris sp.* soit dans l'oligoARN rajouté lors de la rétrotranscription des ARN pour *P. humanus humanus*. De même, pour les 3' RACE PCR, le premier couple d'amorces est défini avec une amorce sens dans la région codante spécifique du gène d'intérêt et une amorce antisens dans la queue polyA (polyadénylation) pour *Parascaris sp.* ou dans la séquence rajoutée après la queue polyA pour *P. humanus humanus*. Après la première réaction de PCR, le produit du 1^{er} tour est dilué à 1/70 pour servir de matrice au 2^e tour de PCR. Un deuxième couple d'amorce plus interne est défini dans les mêmes régions. Le protocole des PCR est indiqué dans le **Tableau 7**.

	Phusion polymérase			Taq polymérase		
	Température	Temps	Nombre de cycles	Température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	98°C	1 min		94°C	1 min	
Dénaturation	98°C	30 s	45 cycles	94°C	30 s	45 cycles
Hybridation	54-70°C	30 s		54-58°C	30 s	
Elongation	72°C	2 min		72°C	2 min	
Elongation finale	72°C	8 min		72°C	8 min	
	15°C	15 s		15°C	15 s	

Tableau 7 : Conditions de PCR en fonction de l'ADN polymérase utilisée

2. Amplification des séquences codantes des sous-unités

Les séquences codantes complètes des sous-unités sont amplifiées en PCR nichées avec la Phusion High Fidelity Polymerase (New England BioLabs) qui présente un très faible taux d'erreurs lors de la réplication (1 μ L d'ADNc, tampon GC 1X (contenant MgCl_2 1,5 mM), dNTPs 0,2 mM chacun, amorces 0,5 μ M, Phusion polymérase 0,02 U/ μ L, eau qsp 20 μ L). Un premier couple d'amorce est défini dans les 5'UTR et 3'UTR (untranslated regions) et un deuxième couple plus interne est défini pour encadrer le codon d'initiation de la traduction et le codon stop. De plus, le 2^e couple d'amorce contient une quinzaine de nucléotides supplémentaires en 5' correspondant aux régions flanquantes des sites d'intégration XhoI et ApaI dans le plasmide de transcription pTB207 (**Annexe 3**). Les sites d'intégration permettent une insertion orientée du produit de PCR dans le vecteur.

3. Amplification de promoteur

En se basant sur les données génomiques de *Parascaris sp.* disponibles dans GenBank, 3 à 5 kb de la région en amont du codon d'initiation de la traduction sont amplifiées et considérées comme étant la région promotrice de la sous-unités *glc-5*. L'amplification du promoteur se fait en PCR nichées avec deux couples d'amorces dont le 2^e contient dans la partie 3' les nucléotides nécessaires à l'insertion orientée du produit de PCR dans le vecteur pPD95.75 (**Annexe 4**). Dans ces conditions de clonage, le promoteur des sous-unités dirigera l'expression de la GFP contenue dans le plasmide pPD95.75.

4. Clonage dans pGEM-T/pCR-4

Les produits de PCR des 5' et 3' RACE-PCR sont clonés dans les vecteurs pGEM-T (Promega, **Annexe 1**) et pCR-4 (Invitrogen, **Annexe 2**). Ces vecteurs contiennent une cassette de résistance à l'ampicilline pour la sélection des colonies recombinantes sur gélose.

Les produits de PCR des 5' et 3' RACE-PCR de *Parascaris sp.* sont clonés dans le vecteurs pGEM-T (Promega, **Annexe 1**) avec le kit Rapid DNA Ligation kit (Thermo ScientificTM). Pour les séquences de *P. humanus*, le clonage est réalisé dans le vecteur pCR-4 (Invitrogen, **Annexe 2**) avec le kit TOPA TA CloningTM kit for Sequencing (Invitrogen). Après la réaction, le mix est placé dans la glace pour transformation.

5. Clonage dans pTB207

Les clonages des séquences codantes complètes des sous-unités dans le vecteur de transcription pTB207 se font avec le kit In-Fusion HD cloning kit (Takara Bio, Japon). Ce vecteur est composé du promoteur T7, qui contrôle l'expression de la séquence qui sera insérée, et du 3'UTR de la β -globine de xénope nécessaire à la bonne reconnaissance des ARNc par le système de traduction de l'œuf de xénope. De plus, ce vecteur contient une cassette de résistance à l'ampicilline pour la sélection des colonies recombinantes sur gélose (**Annexe 3**). Les quantités d'inserts et de vecteurs à mélanger sont calculées grâce à l'outil [In-Fusion molar ratio calculator](#) (Takara Bio) pour avoir un ratio insert/vecteur optimal de 2 pour 1. Après la réaction, le mix est placé dans la glace pour transformation.

6. Transformation et criblage de colonies

Les bactéries utilisées sont des *Escherichia coli* DG1 thermocopétentes (Eurogentec) conservées à -80°C. Les bactéries sont décongelées dans la glace. Les transformations sont réalisées par un choc thermique classique et les bactéries sont étalées sur des géloses de LB contenant de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g/mL}$ avant d'être laissées à l'étuve à 37°C toute une nuit.

Les colonies sont repiquées et criblées par PCR avec la Taq polymérase (Euromedex, MgCl_2 2 mM, dNTP 0,25 mM, amorces 0,4 μM , Taq polymérase et tampon 1X) ou avec la GoTaq (GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix, Promega, MgCl_2 2 mM, dNTP 0,2 mM, amorces 0,5 μM , GoTaq polymérase et tampon 1X, pH 8,5). Les amorces utilisées encadrent la zone d'insertion de l'insert (amorces M13F et M13R pour pGEMT (**Annexe 1**) et pCR4 (**Annexe 2**), T7P et 207R pour pTB207 (**Annexe 3**) ou amorces spécifiques de l'insert pour les vecteurs pPD95.75 (**Annexe 4**) et pPD96.52). Le profil de PCR est analysé après migration sur un gel d'agarose 1%. Les clones positifs sont mis en incubation dans du milieu LB contenant de l'ampicilline (100 $\mu\text{g/mL}$) toute une nuit.

7. Extraction de plasmides

Les plasmides sont extraits sur 3 mL de culture bactérienne pour les minipreps ou sur 25-50 mL de culture pour les maxiprep avec le kit EZNA Plasmid DNA Mini kit I (Omega Bio-tek, USA). Les constructions sont dosées au nanodrop (Nanodrop One, Ozyme) puis envoyées au séquençage (Eurofins Genomics) pour vérification de la séquence.

Les clones bactériens possédant la bonne séquence d'intérêt sont conservés sous forme de glycérol stocks en mélangeant 850 μL de culture bactérienne avec 150 μL de glycérol dans des cryotubes (Nunc™ Cryotube™ Vials). Les clones sont conservés à -20°C.

D. Linéarisation des plasmides de transcription

Les constructions dans le vecteur pTB207 doivent être linéarisées pour ensuite réaliser la synthèse des ARNc. Les enzymes utilisables pour la linéarisation du vecteur pTB207 sont *PaeI* (*SphI*), *MscI* (*MlsI*), *PacI* ou *NheI*. Toutes permettent de linéariser le plasmide en gardant le promoteur T7 et le 3'UTR de la β -globine de xénope encadrant la séquence codante d'intérêt. Lorsque c'est possible, une combinaison de deux enzymes est utilisée plutôt qu'une pour augmenter le taux de succès de la réaction. Le mix contenant 6 μ g de plasmides, du tampon Fast Digest 1X (ThermoFisher), 5 μ L d'enzymes de restriction dans un volume final complété avec de l'eau à 60 μ L, est placé en incubation 30 min-1 h à 37°C. Les plasmides digérés sont purifiés avec le kit Gel and PCR Clean up (Macherey Nagel) et élués avec 21 μ L d'eau avant d'être dosés au nanodrop. La qualité de la digestion est vérifiée en faisant migrer 300 ng de plasmides linéarisés sur gel d'agarose 0,8 %.

E. Transcription d'ARNc *in vitro*

Les plasmides linéarisés permettent de synthétiser les ARN complémentaires (ARNc) des séquences correspondantes. La transcription *in vitro* se fait avec le kit mMESSAGE mMACHINE® T7 (Ambion™) en suivant les recommandations du fournisseur. Le culot d'ARNc est repris avec 20 μ L d'eau sans RNase avant d'être dosé au nanodrop. La taille et l'intégrité des ARNc sont vérifiées par migration de 300-1000 ng d'ARNc sur gel d'agarose 1%. Les ARNc sont ensuite préparés seuls ou en combinaison à la concentration souhaitée (800-1000 ng/ μ L pour les sous-unités seules et 400-800 ng/ μ L pour chaque sous-unité en combinaison) et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

VI. Electrophysiologie

A. Micro-injection en œufs de *Xenopus laevis*

A leur arrivée, les ovocytes défolliculés (Ecocyte BioScience) sont placés dans la solution d'incubation. Les œufs sont injectés avec 2 x 36 nL de mix à l'aide d'un microinjecteur (Nanoinject II microinjector, Drummond). Une fois injecté, les œufs sont placés à 19°C dans des plaques 96 puits à raison d'un œuf par puit avec de la solution d'incubation. Le temps d'expression des récepteurs et le début des mesures dépend du récepteur étudié (3 jours pour les récepteurs au GABA et 3 à 5 jours pour les GluCls).

B. Enregistrements

Les mesures sont réalisées par la méthode de voltage-clamp à double électrodes (« Two-Electrode Voltage-Clamp ou TEVC) sur un amplificateur OC725C (Warner instrument) et un enregistreur DigiData 1440A (Molecular Devices). Le potentiel de membrane des œufs est maintenu à -60 mV pour les œufs exprimant les récepteurs au GABA et à -80 mV pour œufs exprimant les GluCls. La chambre d'enregistrement où se trouve l'œuf est perfusée en permanence avec la solution d'enregistrement. Les microélectrodes et les masses sont en chlorure d'argent. Elles sont chlorurées régulièrement en les plaçant dans une solution de javel à 10% pendant 30 min-1 h. Les capillaires contenant les microélectrodes sont remplis de chlorure de potassium 3 M et doivent avoir une résistance comprise entre 1 et 20 MΩ. Aucun pont salin n'a été utilisé. Un système de perfusion et de valves (8 au total) permet d'acheminer les molécules à appliquer sur l'œuf (vitesse de perfusion de 20-25 mL/min). Les mesures sont enregistrées par le logiciel Clampex de la suite pClamp 10 (Axon instruments) et analysées manuellement avec le logiciel Clampfit 10. Les amplitudes des courants sont normalisées par rapport à l'amplitude maximale obtenue après application d'une concentration saturante de la molécule d'intérêt.

Les EC₅₀, les IC₅₀ et les coefficients de Hill sont obtenus avec RStudio ou GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA) à partir des valeurs d'amplitude de courants normalisés.

Les courbes d'effets concentrations ont été générées en utilisant l'équation suivante :

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{H(\log EC_{50} - X)}}$$

où Y est la réponse normalisée, H est la pente de la droite de Hill et X est le logarithme de la concentration. La même équation est utilisée pour les courbes d'effet concentration des antagonistes en remplaçant le logEC₅₀ par logIC₅₀. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne +/- SEM (Standard Error of the Mean). Les tests statistiques utilisés sont soit des One-Way ANOVA avec Tukey's Multiple Comparisons Test soit des Student's t-test.

Pour les expériences de compétition sur Phh-RDL avec l'ivermectine et le lotilaner, les courbes d'effets concentration ont été générées selon l'équation suivante (4 paramètres):

$$Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{H(\text{LogEC50} - X)}}$$

où Y est la réponse normalisée, Bottom est la réponse à la concentration minimale, Top est la réponse maximale, H est la pente de la droite de Hill et X est le logarithme de la concentration.

1. Effets doses agonistes

Les effets doses sont réalisés avec des concentrations croissantes de la molécule d'intérêt. Pour les ligands naturels tels que le GABA et le glutamate, le temps d'application est de 5-10 s avec 2 min de lavage entre chaque application.

2. Effets doses antagonistes

Les effets doses antagonistes sont réalisés en pré-appliquant dans un premier temps la molécule antagoniste seule pendant 90 s, puis en co-appliquant cette molécule (lotilaner, ivermectine, fipronil, picrotoxine) avec le ligand naturel pendant 10 s. Après chaque co-application, des temps de lavage de 2 min sont appliqués.

3. Effets agonistes des lactones macrocycliques

Il est connu que les MLs se fixent de façon irréversible sur les GluCl. Par conséquent, une seule application de 5 s d'une ML à une seule concentration est appliquée sur les oeufs exprimant un GluCl. L'amplitude du courant est normalisée par rapport à l'amplitude maximale obtenue suite à la pré-application d'une concentration saturante de glutamate (ou de GABA dans le cas des récepteurs au GABA). Pour Phh-GluCl, l'effet concentration de l'ivermectine a été réalisé en appliquant pendant 20-30 s une faible concentration d'ivermectin (<30 nM) suivi d'une plus forte concentration d'ivermectine (<100 nM). Chaque œuf ne reçoit donc au maximum que deux concentrations différentes d'ivermectine. La normalisation est faite avec une première application de glutamate à 100 µM (concentration saturante de glutamate pour atteindre l'effet maximum).

4. Effets compétiteurs

Les expériences de compétition de l'ivermectine et du lotilaner sur Phh-RDL ont été réalisées comme décrites précédemment par Rufener et al, 2017 (187). Un effet concentration du GABA est réalisé en absence ou en présence de lotilaner à 1 nM et 10 nM ainsi qu'en absence et en présence d'ivermectine à 100 nM et 1 μ M. Le lotilaner ou l'ivermectine sont pré-appliqués sur les œufs pendant 90 s avant de les co-appliquer avec du GABA à 1 – 1000 μ M pendant 10 s avec 30 s de temps de lavage entre chaque application (perfusion continue de lotilaner ou d'ivermectine). L'amplitude des courants est normalisée avec une première application de GABA à 100 μ M (concentration saturante de GABA pour atteindre l'effet maximum).

5. Analyses perméabilité ionique

Pour étudier la perméabilité des récepteurs au sodium et au chlore, le NaCl est complètement ou partiellement remplacé par le chlorure de tétraéthylammonium (TAECl, Sigma-Aldrich) ou par l'acétate de sodium pour respectivement éliminer les ions sodium ou chlore. Ces solutions de Ringer modifiées sont diluées avec la solution de Ringer normale à 1/16, 1/8, 1/4, 1/2 de façon à avoir des gammes de concentrations en sodium de 0, 12,5, 25, 50, 75 et 100 mM et des gammes de concentrations en chlore de 4, 16,5, 29, 54, 79 et 104 mM. Les œufs sont perfusés avec ces différentes solutions et un protocole ramp est réalisé lors de l'application d'une concentration saturante de ligand naturel (glutamate ou GABA). Après chaque application de glutamate, l'œuf est lavé 1 min avec la solution de Ringer normale puis 10 s avec la solution contenant plus ou moins de sodium ou de chlore avant d'appliquer le ligand naturel. Le potentiel d'inversion est identifié pour chaque concentration de sodium et de chlore afin de réaliser la courbe du potentiel d'inversion en fonction de la concentration en sodium ou en chlore.

C. Robocyte II

Le Robocyte II (Multi Channel Systems) est un appareil permettant des analyses automatisées de canaux ioniques exprimés en œufs de *X. laevis* par la technique de voltage-clamp en double électrodes. Après microinjection des ARNc, les œufs de xénope sont déposés individuellement dans chaque puit d'une plaque 96 puits. Le robocyte équipé d'une paire d'électrodes et d'un système de 12 perfusions passe d'un œuf à l'autre pour réaliser les mesures nécessaires. Cet outil permet de tester plus d'œufs qu'en condition manuelle (peut fonctionner 24h/24). De plus, le robocyte est capable d'enregistrer des courants de l'ordre de la dizaine de nA avec de faibles bruits de fonds. Enfin, la quantité importante de liquide à perfuser sur les œufs avec l'installation manuelle limite les tests de certaines nouvelles molécules disponibles en faible quantité ou ayant des coûts très élevés. Le robocyte consomme peu de réactifs (0,1 à 10 mL/min ajustable) par rapport à une installation manuelle et permet donc de réaliser des effets doses en économisant le matériel.

VII. Manipulation de *C. elegans*

A. Culture et entretien

Les *C. elegans* utilisés sont maintenus dans des conditions de culture standard définies par S. Brenner, 1974 (294). Les vers sont cultivés sur des boîtes de Pétri gélées contenant du milieu de croissance de nématode (NGM pour Nematode Growth Medium) recouvert partiellement d'*Escherichia coli* OP50 à 21°C. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri (60 mm x 15 mm) à raison de 7,5 mL par boîte. Les boîtes sont mises à sécher 2 jours à température ambiante avant d'y déposer 180 µL d'*Escherichia coli* OP50. Les bactéries poussent en 2 jours à température ambiante ou en 1 jour à 37°C. Des larves de *C. elegans* au stade L4 sont transférées sur de nouvelles boîtes deux fois par semaine pour entretenir les lignées.

B. Microinjection

Les *C. elegans* au stade L4 sont transférés sur une nouvelle boîte 3 jours avant la microinjection (correspondant à leur temps de génération de 3 jours) afin d'en avoir en quantité suffisante. Les constructions sont microinjectées dans les gonades des stades L4 selon le protocole précédemment défini par Mello et al, 1991 (295).

Les mix à injecter comprennent la construction à 50 ng/µL et un plasmide rapporteur à 5 ng/µL exprimant la mCherry dans les muscles. Les mix sont préalablement centrifugés 20 min à 14 000 g pour faire culoter les petits débris qui pourraient boucher l'aiguille. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et une 2^e centrifugation est réalisée. Les aiguilles (Harvard Apparatus 1.0 OD x 0,58 ID x 100 L mm Capillaries SM100F-10) sont remplies avec 4 µL du mix grâce à des cônes très fins (Femtotip Microloader tips for femtojet microinjector, Eppendorf AG). Les microinjections se font avec le Fento Jet4i (Eppendorf AG). Le bout de l'aiguille est cassé mécaniquement en mettant le bout de l'aiguille en contact avec une surface solide.

Les vers sont déposés sur des pads d'agarose préalablement préparés (goutte de solution d'agarose 2% écrasée sur lame de verre et laissée sécher 24 h à 37°C) ce qui permet d'immobiliser les vers par déshydratation pour la microinjection. De l'huile (Halocarbon oil 700, Sigma-Aldrich) est également déposée sur le pad pour que les vers ne s'assèchent pas trop vite. Une injection est effectuée dans une des deux gonades des vers. Après l'injection, les vers sont transférés sur une nouvelle boîte en utilisant une goutte de M9 pour aider à les décoller du pad d'agarose. Les vers sont maintenus pendant 3 jours à 21°C avant de vérifier à la loupe à fluorescence (LEICA FDC 3000G Model MDG41, Leica Biosystems) s'il y a une génération F1 recombinante.

C. Expression de promoteurs de GluCls de parasites

La construction dans le vecteur pPD95.75 comprenant le promoteur de *glc-5* de *Parascaris sp.* contrôlant l'expression de la GFP a été microinjectée dans les gonades de *C. elegans* N2 au stade L4. Trois jours après, les vers exprimant la GFP sont sélectionnés sous la loupe à fluorescence puis déposés sur une lame de verre avec du milieu M9 + 10% de glycérol. Les photos sont prises à l'aide du microscope à fluorescence inversé Axiovert 200 M avec le système apotome (Zeiss) et une caméra CDD AxioCam (Zeiss) en utilisant le logiciel Axiovision software (Zeiss).

D. Expression de *Pun-glc-5* dans *C. elegans* et tests de mobilité

La séquence codante de *Pun-glc-5* est sous clonée dans le vecteur pPD95.75 contenant le promoteur de *Pun-glc-5* préalablement validé par l'expression du promoteur seul contrôlant l'expression de la GFP. Cette construction (50-150 ng/μL) est co-injectée avec le plasmide rapporteur *myo2 : mCherry* (5 ng/μL) dans la souche JD369 (quadruple mutant *avr-14*, *avr-15*, *glc-1* et *glc-3* résistant à l'ivermectine).

Les vers contrôles N2 et les lignées recombinantes exprimant *Pun-glc-5* (générations F1 à F5) sont transférés sur de nouvelles boîtes la veille des expérimentations afin d'avoir tous les vers au même stade (sélection de L4 la veille pour avoir de jeunes adultes le jour de l'expérience). Un jeune adulte est placé dans un puit d'une plaque 96 puits contenant du M9 avec 0,1% de BSA. Après 10 min de contact avec le milieu, le nombre de mouvements effectués par chaque ver est compté visuellement pendant 1 min. Un mouvement est considéré comme étant le déplacement d'au moins la moitié du corps d'un côté et de l'autre. De même, le nombre de mouvements des différentes souches est compté après mise en contact avec l'ivermectine à 150 nM (préparé dans du M9 + 0,1% BSA) pendant 10 min. Les comparaisons statistiques sont réalisées avec des tests Kruskal-Wallis avec ajustement Bonferroni.

VIII. Tests de molécules sur les poux *in vivo*

Les molécules pour lesquelles leurs activités pédiculicide et lenticide ont été évalués incluent l'ivermectine, le fipronil, la picrotoxine et le lotilaner (Credelio™). Les molécules sont préalablement diluées à 1–100 μM dans de l'eau et appliquées directement sur les poux adultes ou les lentes (application topique). La survie et le niveau d'immobilisation (appelé knockdown) sont évalués visuellement au cours du temps (t0, t1h, t2h, t3h et t24h) sur 44 poux pour chaque molécule testée. Le taux d'éclosion des lentes est mesuré pendant plusieurs jours après incubation avec du lotilaner et de l'ivermectine à 100 μM dans trois expériences indépendantes. De l'eau et du DMSO à 1% sont utilisés dans chaque test comme contrôles négatifs.

RESULTATS

I. Etude des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des sous-unités de GluCl conservées chez les nématodes

Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise dans le journal *British Journal of Pharmacology* dont la première version avant peer-review est disponible sur BioRxiv doi.org/10.1101/2020.12.17.423223

Cet article a pour titre « *Functional investigation of conserved glutamate receptor subunits reveals a new mode of action of macrocyclic lactones in nematodes* » et est inclus à la fin de cette section.

CONTEXTE

Les nématodes sont répartis dans plusieurs clades (I à V) et incluent des nématodes libres et des nématodes parasites impactant la santé humaine et animale (10). Le clade III des nématodes regroupe un grand nombre de parasites dont les nématodes filaires et les ascaris qui sont considérés comme les nématodes impactant le plus la santé humaine et animale. En effet, les nématodes filaires sont responsables de maladies très handicapantes telles que *Brugia malayi* responsable de la filariose lymphatique entraînant des hydrocèles et l'éléphantiasis chronique. Quant à eux, les ascaris sont retrouvés partout dans le monde et touchent 800 millions de personnes chaque année ainsi que les animaux (296), tels que les équidés avec *Parascaris univalens*. A ce jour, le contrôle du parasitisme humain et animal passe principalement par l'utilisation d'anthelminthiques dont le fer de lance sont les lactones macrocycliques (98).

Les lactones macrocycliques (MLs) ont un spectre large d'activité et sont massivement utilisées en médecine humaine et vétérinaire pour lutter aussi bien contre les endoparasites que contre les ectoparasites. Cependant, cette utilisation intensive a irrémédiablement conduit à la propagation de parasites résistants à travers le monde. Chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*, les MLs ciblent principalement les canaux chlorure glutamate dépendant (GluCls) dont 6 gènes codant des sous-unités ont été identifiés : *avr-14*, *avr-15*, *glc-1*, *glc-2*, *glc-3* et *glc-4*. Chez *C. elegans*, à l'exception de GLC-4, toutes les sous-unités forment des récepteurs homomériques fonctionnels (121,171,207,227). De plus, chacun de ces récepteurs est sensible à l'ivermectine à l'exception de GLC-2. Certaines sous-unités sont également capables de s'associer pour former des récepteurs hétéromériques avec de nouvelles propriétés pharmacologiques. C'est le cas de GLC-2 qui s'associe à GLC-1 et AVR-15B chez *C. elegans* (121,233) ainsi qu'avec AVR-14B chez *Cooperia oncophora* (170) et *Haemonchus contortus* (177). Cependant, la diversité des sous-unités codant les GluCls ainsi que le mode d'action des MLs restent largement méconnus chez des nématodes parasites d'intérêt majeur en santé humaine (*B. malayi*) et animale (*P. univalens*).

OBJECTIFS

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail était d'explorer la diversité des sous-unités codant les GluCls chez les deux nématodes parasites *B. malayi* (filiaire humaine) et *P. univalens* (ascaris des équidés) afin de les comparer avec les GluCls du nématode modèle *C. elegans*.

Après avoir défini quelles sous-unités étaient conservées dans ces trois espèces (AVR-14, GLC-2, GLC-3 et GLC-4), le second objectif était de trouver la bonne composition en sous-unités nécessaire à la formation de récepteurs fonctionnels en utilisant le système d'expression hétérologue œuf de *Xenopus laevis*.

Enfin, le troisième objectif était et de caractériser pharmacologiquement les cibles identifiées et de comparer l'effet des MLs sur ces récepteurs.

METHODES

L'identification des sous-unités de GluCls de *B. malayi* et *P. univalens* s'est faite en réalisant des BLAST des séquences connues de GluCls de *C. elegans* dans les bases de données génomiques et transcriptomiques (NCBI, Sanger Institute et WormBase Parasite). Des séquences codantes partielles ont pu être identifiées. Cela a permis de définir des amorces pour amplifier et identifier les séquences codantes manquantes par RACE-PCR. Les résultats de séquençage ont permis de définir de nouvelles amorces pour amplifier les séquences codantes complètes de chaque sous-unité pour les cloner dans un vecteur de transcription permettant la transcription des ARNc correspondants.

Les sous-unités ont été exprimées seules ou en combinaison dans le système d'expression hétérologue œuf de xénope pour déterminer la bonne composition en sous-unités nécessaire pour former des récepteurs fonctionnels et réaliser leur caractérisation pharmacologique par des mesures d'électrophysiologie en utilisant la technique de voltage-clamp à double électrodes. Aussi, l'effet des MLs sur les récepteurs identifiés a été étudié par des mesures d'électrophysiologie.

RESULTATS

Chez *C. elegans*, 6 sous-unités de GluCls ont été précédemment identifiées. Les recherches dans les bases de données ont permis d'identifier 4 sous-unités chez *B. malayi* et 5 sous-unités chez *P. univalens*. Parmi ces sous-unités, deux ne sont retrouvées que chez *C. elegans* (*avr-15* et *glc-1*), une n'est retrouvée que chez *P. univalens* (*glc-5*) et quatre sont très conservées dans ces trois espèces : *avr-14*, *glc-2*, *glc-3* et *glc-4* (**Figure 1, Table 1**) sur lesquelles cette étude s'est focalisée. Chez *C. elegans*, AVR-14B et GLC-2 forment des récepteurs fonctionnels répondant à des concentrations de glutamate de l'ordre du μM avec des courant de l'ordre du μA . GLC-3 est également capable de former seul un récepteur fonctionnel mais ne produit des courants que de l'ordre du nA après une stimulation avec des mM de glutamate. A l'inverse, les quatre sous-unités de *B. malayi* et *P. univalens* ne forment pas de récepteurs homomériques fonctionnels à l'exception de Bma-AVR-14B, Pun-AVR-14B et Pun-GLC-3 qui ne répondent qu'à des concentrations en glutamate de l'ordre du mM (**Figure 2**).

La coexpression de la sous-unité GLC-2 avec d'autres sous-unités a montré que celle-ci s'associe avec AVR-14B dans les ovocytes de xénope pour les trois espèces de nématodes (**Figure 3**). Cette combinaison est sensible au glutamate avec des EC_{50} observées de $20,5 \pm 1,3$ (n = 8) pour *C. elegans*, $32,5 \pm 5,1$ μ M (n = 7) pour *B. malayi* et $13,6 \pm 1,6$ μ M (n = 5) pour *P. univalens* (**Table 2**). Les récepteurs AVR-14B/GLC-2 des trois espèces sont sensibles à une large gamme de MLs disponibles sur le marché incluant l'abamectine, la doramectine, l'éamectine, l'éprinomectine, l'ivermectine, la moxidectine et la sélamectine. L'éamectine semble être l'agoniste le plus rapide d'action sur ces trois récepteurs (**Figure 4**). Nous avons également montré que GLC-2 s'associe à GLC-3 chez *C. elegans* et *P. univalens* mais pas chez *B. malayi* (**Figure 5**). L'ivermectine, la moxidectine et l'éprinomectine agissent comme des agonistes sur GLC-2/GLC-3 de *C. elegans* tandis qu'elles n'activent pas directement GLC-2/GLC-3 de *P. univalens* (**Figure 6**). En revanche, la coapplication d'ivermectine ou de moxidectine avec du glutamate ont montré que ces deux MLs potentialisent l'effet du glutamate sur Pun-GLC-2/GLC-3 (**Figure 7**).

DISCUSSION

Cette étude illustre la diversité des GluClIs existante chez les nématodes libres et parasites autant en termes de gènes codant des sous-unités qu'en terme de combinaisons possibles pour la formation de récepteurs fonctionnels. Pour les nématodes de clade V (*C. elegans*, *C. oncophora* et *H. contortus*), certaines sous-unités telles qu'AVR-14B et GLC-2 forment des récepteurs homomériques fonctionnels (170,171,177) tandis que les nématodes parasites de clade III (*B. malayi* et *P. univalens*) ont besoin de s'associer pour former des récepteurs hétéromériques fonctionnels en œufs de xénope.

Aussi, cette étude montre le rôle clef de GLC-2 dans la composition de récepteurs hétéromériques pour les trois nématodes d'intérêt. En œufs de xénope, GLC-2 s'associe à AVR-14B chez des nématodes de clades III et V et est sensible à une large gamme de MLs dont l'éamectine semble la plus rapide d'action. Cependant, au regard des résultats, la différence d'efficacité des lactones macrocycliques observée *in vivo* ne semble pas corrélée à leur efficacité sur les récepteurs exprimés *in vitro* en œufs de xénope. De plus, un nouveau sous-type de GluCl retrouvé chez *C. elegans* et *P. univalens*, GLC-2/GLC-3, est caractérisé ici pour la première fois et présente des propriétés pharmacologiques originales dépendantes de l'espèce de nématode. Chez *C. elegans*, ce récepteur GLC-2/GLC-3 présente les caractéristiques connues des GluClIs qui sont activés par les MLs. A l'inverse, le récepteur GLC-2/GLC-3 de *P. univalens* n'est pas directement activé par les MLs, ce qui est une propriété rare chez les GluClIs et uniquement observée à jour pour la sous-unité GLC-2 lorsqu'elle est exprimée seule en œufs de xénope (121,170,177).

Bien qu'un nombre réduit de gènes ait été identifié par rapport à d'autres familles de LGICs, ces résultats montrent que la diversité des GluClIs est complexe et varie suivant l'espèce de nématode. De plus, cette complexité n'est pas encore totalement comprise même chez le nématode modèle *C. elegans*. L'identification d'un nouveau sous-type de GluCl qui n'est pas directement activé par les MLs en fait une nouvelle cible pharmacologique très intéressante pour le développement de nouvelles molécules antiparasitaires.

**ARTICLE: FUNCTIONAL INVESTIGATION OF CONSERVED GLUTAMATE RECEPTOR
SUBUNITS REVEALS A NEW MODE OF ACTION OF MACROCYCLIC LACTONES IN
NEMATODES**

Nicolas Lamassiaude¹, Elise Courtot¹, Angélique Corset¹, Claude L. Charvet¹ and Cédric Neveu¹

¹INRAE, Université de Tours, ISP, 37380, Nouzilly, France

Soumission à British Journal of Pharmacology

Première version avant correction accessible sur BioRxiv (doi.org/10.1101/2020.12.17.423223)

Functional investigation of conserved glutamate receptor subunits reveals a new mode of action of macrocyclic lactones in nematodes

Nicolas Lamassiaude¹, Elise Courtot¹, Angélique Corset¹, Claude L. Charvet¹ and Cédric Neveu¹

¹INRAE, Université de Tours, ISP, 37380, Nouzilly, France

Abstract

Glutamate-gated chloride channels receptors (GluCl) are involved in the inhibition of neurotransmission in invertebrates and represent major molecular targets for therapeutic drugs. Macrocyclic lactones (MLs), which target GluCl, are widely used as anthelmintic to treat parasitic nematodes impacting both human and animal health. Despite massive use of MLs since the 80's, the exact molecular targets of these drugs are still unknown in many important parasites species. Among the GluCl subunit encoding genes, *avr-14*, *glc-2*, *glc-3* and *glc-4* are highly conserved throughout the nematode phylum. Using the *Xenopus* oocyte as an expression system, we pharmacologically characterized these GluCl subunit genes from the model nematode *C. elegans*, the human filarial nematode *B. malayi* and the horse nematode parasite *P. univalens*. With the striking exception of *C. elegans*, expression of subunits as homomeric receptors was not reliable and needed glutamate application at the mM range to induce low currents at the nA range. In contrast, the co-expression of GLC-2 and AVR-14B lead to the formation of a ML-sensitive receptor in the three nematode species. In addition, we demonstrated that for *C. elegans* and *P. univalens*, GLC-2 co-assembled with GLC-3 to form a new GluCl subtype with distinct pharmacological properties. Whereas 1 μ M ivermectin, moxidectin and eprinomectin acted as agonist of the GLC-2/GLC-3 receptor from *C. elegans*, they did not directly activate GLC-2/GLC-3 of *P. univalens* but potentialized glutamate elicited currents thus representing a unique pharmacological property.

In conclusion, we highlight the GluCl diversity among free-living and parasitic nematodes and showed the importance of GLC-2 as a key subunit in the composition of heteromeric channels in parasites. Second, we demonstrated that the MLs act on novel GluCl subtypes that show unusual pharmacological properties making them potential pharmacological targets for drug-screening.

Introduction

The phylum *Nematoda* is divided into five major clades (I to V) that include free living and parasitic nematodes (1,2) impacting both human and animal health (1). Among the nematodes from clade III, *Filarioidea* and *Ascaridoidea* are considered to have the greatest impact on both human and animal health (3). In this study, we focus our research on two parasitic nematode species representative of human filarids and animal ascarids: *Brugia malayi*, a human lymphatic filarid which is the causative agent of chronic elephantiasis in the south and south-east of Asia (4) and *Parascaris sp.* which are responsible for equine ascaridiosis, a major issue in equine health (5,6). Without effective vaccine or alternative strategies (7), the use of anthelmintic treatments remains the standard control strategy for parasitic nematodes.

Among the available anthelmintic drugs, the broad-spectrum macrocyclic lactones (MLs) are highly effective and are massively used in human and veterinary medicine (8). The MLs include avermectins (ivermectin, doramectin, eprinomectin, abamectin, selamectin) and milbemycins (moxidectin, milbemycin-oxime, nemadectin) that are potent against both endo- and ectoparasites (9). The morbidity and socio-economic impact of human lymphatic filariasis motivated control programs led by the World Health Organization (WHO) with ivermectin (IVM) as a spearhead of eradication operations (10). For the control of *Parascaris sp.* infestations, three drug classes currently have marketing approval including benzimidazoles, pyrantel and MLs (ivermectin and moxidectin), the most widely used family. Unfortunately, because of the massive use of MLs, treatment failures and resistant parasites have been reported worldwide (11). Resistance to MLs is spreading fast and has currently been reported in a wide range of parasitic nematode species such as *Onchocerca volvulus* (12), *Cooperia oncophora* (13,14), *Dirofilaria immitis* (15,16), *Haemonchus contortus* (17) and *Parascaris sp.* (18–25). Resistance is considered as multifactorial as it can raise from different molecular events such as: receptor subunit mutations (26–31), decrease of the target expression level (17,32) and the efflux mechanisms involving cell membrane transporter such as P-glycoprotein (33,34).

Despite this knowledge, the mode of action of the MLs at the physiological and molecular levels as well as the mechanisms involved in resistance remain unclear for most of the parasitic nematodes. In this context, a better understanding of MLs mode of action is essential for the control of resistance and the development of novel therapeutical strategies (35).

In the free-living model nematode *Caenorhabditis elegans*, MLs act as allosteric modulators of glutamate-gated chloride channels (GluCl_s) (36). Exposure to MLs hyperpolarizes the membrane and inhibits the neurotransmission (37–39) leading to flaccid paralysis of the worms (26). GluCl_s are made of five subunits combining together to form either homo- or heteromeric receptors (40,41). In order to investigate the subunit composition and

the pharmacological properties of nematode GluCl_s, the *Xenopus laevis* oocyte has proven to be an efficient heterologous expression system (42).

In *C. elegans*, six GluCl genes were identified and named *avr-14* (26,28), *avr-15* (38,43), *glc-1* (36,44), *glc-2* (36), *glc-3* (45) and *glc-4* (46). All the subunits but GLC-4 were shown to give rise to functional homomeric receptors when expressed in *Xenopus laevis* oocytes. All functional receptors were ivermectin-sensitive with the exception of Cel-GLC-2 which is not. However, it has been reported that the *C. elegans* GLC-2 subunit co-assembles with Cel-GLC-1 (36) or Cel-AVR-15 (43) to form two ivermectin-sensitive heteromeric GluCl_s subtypes with distinct pharmacological properties.

In contrast with *C. elegans*, only few functional GluCl_s have been characterized so far in parasitic nematodes. The AVR-14B subunit was reported to form a functional homomeric GluCl_s in *H. contortus* (28,47,48) and *Dirofilaria immitis* (49). Interestingly, in *Cooperia oncophora* (27) and *Haemonchus contortus* (50), GLC-2 also combined with AVR-14B to form a heteromeric GluCl subtype sensitive to ivermectin. Although GluCl_s are relatively well studied in clade V nematodes, the GluCl diversity and the mode of action of MLs remains poorly understood in human and animal parasitic nematodes of clade III.

In the present study, we describe new GluCl subtypes made of highly conserved subunits from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens* and investigate their respective sensitivity to a wide range of MLs. We report that GluCl subunits of parasitic nematodes are not able to form homomeric robust glutamate-sensitive channels but need to combine with GLC-2 to form functional receptors. Overall, our findings bring new insights in the diversity, the composition and the pharmacology of nematode GluCl subtypes as well as in the mode of action of MLs. This work highlights the potential of the new GluCl subtypes as drug targets and opens the way to target-based drug screening and the development of new anthelmintic.

Results

GluCl diversity in nematode from clade III and V

Searches for homologs of GluCl subunits encoding genes from *C. elegans* (i.e. *glc-1*, *glc-2*, *glc-3*, *glc-4*, *avr-14* and *avr-15*) (26,36,38,43,45,46) in *B. malayi* and *P. univalens* genomic/transcriptomic databases, allowed the identification of 4 independent sequences corresponding to putative homologs of *avr-14*, *glc-2*, *glc-3* and *glc-4* from both species whereas no homolog could be found in *B. malayi* and *P. univalens* for *glc-1* nor *avr-15*. The

corresponding full-length cDNA of *avr-14*, *glc-2*, *glc-3* and *glc-4* from the three nematode species were cloned into a transcription vector for subsequent functional analysis. All GluCl subunits identified including AVR-14B, GLC-2, GLC-3 and GLC-4 from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens* present the typical characteristics of cys-loop receptor subunit. This includes, a predicted signal peptide in the extracellular N-terminal part (with the exception of Bma-GLC-2), the first cys-loop domains specific of Ligand-gated ion channels (LGIC) which is composed of two cysteines that are 13 amino acid residues apart, the second cys-loop domain found in GluCl subunits and four transmembrane domains (TM1-4) (**Fig. S2 and Fig. S3**).

Compare to *C. elegans*, the GluCl deduced amino-acid sequences of *B. malayi* and *P. univalens* respectively show an amino-acid identity of 78.4% and 80.3% for AVR-14B, 64.1% and 67.2% for GLC-2, 66.5% and 67.8% for GLC-3 and 64.8% and 66.6% for GLC-4 (**Table 1**). A phylogenetic analysis including GluCl sequences from *C. elegans* (Cel), *B. malayi* (Bma), *H. contortus* (Hco) and *P. univalens* (Pun) confirmed the orthologous relationship of the parasitic subunit sequences with their respective counterparts in *C. elegans* (**Fig. 1**). The identified sequences were then named according to the nomenclature proposed by Beech et al (51).

Functional expression of homomeric GluCl receptors of *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens* reveals distinct functional profile between free-living and parasitic nematodes

In order to decipher the ability of each subunits to form functional homomeric GluCl receptors from the three different species, we injected their respective cRNA (*avr-14b*, *glc-2*, *glc-3* and *glc-4*) singly in the *Xenopus laevis* oocyte heterologous expression system (43). Three to five days post injection, we recorded currents elicited by 1 mM glutamate using two-electrode voltage-clamp (**Fig. 2A**).

We used *C. elegans* as a validation model, because it has previously been shown that AVR-14B (26,28), GLC-2 (36) and GLC-3 (45) all give rise to functional glutamate-sensitive homomeric channels when expressed in *Xenopus* oocytes. In this study, for the model nematode, expression of AVR-14B or GLC-2 alone formed functional homomeric receptors with robust glutamate elicited currents with amplitude in the μA range: $2.1 \pm 0.4 \mu\text{A}$ ($n = 16$) and $9.1 \pm 0.5 \mu\text{A}$ ($n = 32$) for Cel-AVR-14B and Cel-GLC-2 respectively (**Fig. 2A, Table 2**). Cel-GLC-3 was also able to form functional receptors, however 1 mM glutamate application produced significant smaller peak currents ($285 \pm 54 \text{ nA}$, $n = 50$, **Table 2**) than homomeric channels composed of Cel-AVR14B ($p < 0.001$) or Cel-GLC-2 ($p < 0.001$) (**Fig. 2A**); which is in agreement with previous studies (26,36,45). We didn't observe currents following glutamate application on oocytes expressing Cel-GLC-4 subunits ($n = 18$).

Unlike *C. elegans*, where three out of four GluCl subunits formed functional homomeric receptors, for *B. malayi*, only the expression of AVR-14B subunit in oocytes allowed the recording of very weak currents (413 ± 132 nA, $n = 23$, **Fig. 2A**), significantly smaller than those obtained with Cel-AVR-14B ($p < 0.001$). For *P. univalens*, the expression of AVR-14B subunit also allowed the formation of homomers, with current amplitudes of 200 ± 80 nA ($n = 9$), similar to the Bma-AVR-14B receptor ($p = 1$, **Fig. 2A**). Furthermore, we observed currents on the expression of Pun-GLC-3 whose mean amplitudes was 77 ± 14 nA, ($n = 11$) significantly smaller than Cel-GLC-3 receptors ($p < 0.05$, **Fig. 2A**). However, in our hands, neither the expression of Bma-GLC-2 ($n = 11$), Pun-GLC-2 ($n = 11$), Bma-GLC-3 ($n = 14$), Bma-GLC-4 ($n = 13$) nor Pun-GLC-4 ($n = 12$) resulted in the expression of functional receptors.

In this study, *C. elegans* GluCl subunits form functional homomeric receptors responding to 1 mM glutamate (AVR-14B, GLC-2 and with a lower response GLC-3) while parasitic GluCl subunits of *B. malayi* and *P. univalens* either did not respond (Bma/Pun-GLC-2, Bma-GLC-3 and Bma/Pun-GLC-4) or gave only small responses (Bma/Pun-AVR-14B and Pun-GLC-3) to 1 mM glutamate stimulation. Taken together, these results suggested that in contrast with *C. elegans*, parasitic nematode GluCl subunits are not able to form robust homomeric channels. Because the literature strongly supports the pivotal role of GLC-2 in heteromeric GluClS (27,36,43,50), the putative interaction of GLC-2 with other subunits has been further explored in the three nematode species.

GLC-2 has a critical role in GluCl composition

In order to confirm the hypothesis that GLC-2 was a good candidate for heteromeric receptor expression in *Xenopus* oocytes, we challenged oocytes expressing GLC-2 in combination with AVR-14B or GLC-3 or GLC-4 with 1 mM glutamate for each species.

Firstly, we challenged the AVR-14B subunits in combination with GLC-2 for the three different species. For *C. elegans*, the co-expression of both subunit cRNAs led to the robust expression of receptors with a mean current amplitude of 4.81 ± 0.4 μ A ($n = 21$), significantly higher than Cel-AVR-14B alone ($p < 0.05$) but smaller than Cel-GLC-2 alone ($p < 0.05$), suggesting that the subunits were able to form heteromeric receptors distinguishable from homomeric receptors. For *B. malayi*, the combination of AVR-14B and GLC-2 led to the robust expression of receptors sensitive to 1 mM glutamate (**Fig. 2B**) with a current peak of 5.6 ± 0.4 μ A ($n = 31$) (**Table 2**), 13-fold higher than the current peak of Bma-AVR-14B alone ($p < 0.001$). In the same way, with the co-expression of *avr-14b* and *glc-2* cRNAs of *P. univalens*, we recorded currents of 2.3 ± 0.3 μ A ($n = 17$, **Fig. 2B**), 11-fold higher than the homomeric channel made of Pun-AVR-14B ($p < 0.001$).

Secondly, to test whether the GLC-2 subunit was able to assemble with GLC-3, we co-expressed both subunits together in *Xenopus* oocytes. Strikingly, for *C. elegans*, we recorded strong currents elicited by 1 mM glutamate ($3.7 \pm 0.4 \mu\text{A}$, $n = 59$) significantly different from homomeric receptors made of GLC-2 ($p < 0.001$) or GLC-3 ($p < 0.001$), suggesting that these subunits were able to form heteromeric receptors. Whereas for *B. malayi*, we didn't observe any functional receptor with GLC-2/GLC-3 ($n = 8$), however for *P. univalens*, we recorded robust expression of glutamate sensitive receptors with a current amplitude of $5.3 \pm 0.6 \mu\text{A}$ ($n = 45$), significantly higher than the homomeric receptor formed by Pun-GLC-3 ($p < 0.001$, **Fig. 2B, Table 2**). Pun-GLC-2/GLC-3 receptor responses were similar to those of Cel-GLC-2/GLC-3 ($p > 0.2$).

Then, we tested the combination of GLC-2 with GLC-4 for all species. Strikingly, we only recorded very low current ($490 \pm 106 \text{ nA}$, $n = 14$) with Cel-GLC-2/GLC-4 expression (**Fig. 2B, Table 2**) in comparison to its homomeric Cel-GLC-2 counterpart. Interestingly, this was previously observed with GLC-1 which modulates the glutamate sensitivity of GLC-2 with an increased glutamate EC_{50} (36) (**Table 2**). Finally, we tested the combination of GLC-3 and GLC-4 subunit for all species. After 1 mM glutamate stimulation, no currents were recorded from oocytes injected with Bma-GLC-3/GLC-4 ($n = 13$) though nA currents were recorded for Cel-GLC-3/GLC-4 and for Pun-GLC-3/GLC-4. However, these currents were not different in comparison with homomeric GLC-3 channels ($p = 1$ and $p = 0.12$ for *C. elegans* and *P. univalens* respectively, **Fig. 2B, Table 2**) suggesting the two subunits don't co-assemble in *Xenopus* oocytes.

These results demonstrate that GLC-2 from the three different species plays a pivotal role in the formation of glutamate sensitive heteromeric receptor including AVR-14B or GLC-3.

AVR-14B/GLC-2 from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens* form GluCl subtypes sensitive to a wide range of macrocyclic lactones

In order to confirm Cel-AVR-14B and Cel-GLC-2 combined, we challenged oocytes expressing both subunits singly or in combination with glutamate concentrations ranging from 1 to 30000 μM , to determine the concentration-response curve and to compare the EC_{50} of each receptor. Representative currents induced by glutamate on the combination are shown in **Fig. 3A**. We calculated a glutamate EC_{50} value of $112.3 \pm 13 \mu\text{M}$ ($n = 5$), $214.6 \pm 13.1 \mu\text{M}$ ($n = 5$) and 20.5 ± 1.3 ($n = 8$), for the Cel-AVR-14B, Cel-GLC-2 and the heteromeric Cel-AVR-14B/GLC-2 receptor respectively (**Fig. 3B, Table 2**). Cel-AVR-14B/GLC-2 channel showed a higher sensitivity for glutamate compare to

the homomeric receptors formed with AVR-14B ($p < 0.001$) or GLC-2 ($p < 0.001$) with 5- and 10-fold lower EC_{50} , respectively.

For *B. malayi*, where GLC-2 alone did not form functional homomeric receptors, the injection of cRNA encoding Bma-AVR-14B alone or Bma-AVR-14B/GLC-2 led to the expression of two distinct functional receptors responsive to glutamate (**Fig. 2; Fig. 3C**). With current amplitudes normalized to the maximal response obtained with a saturating glutamate concentration, we determined the glutamate EC_{50} value for both receptors. For the homomeric AVR-14B receptor glutamate EC_{50} was $758.9 \pm 82 \mu M$ ($n = 5$), whereas for the heteromeric receptor made of Bma-AVR-14B and Bma-GLC-2 glutamate EC_{50} was $32.5 \pm 5.1 \mu M$ ($n = 7$). Such difference of glutamate sensitivity between these two receptors provides strong evidence that AVR-14B and GLC-2 subunits combine to form a novel GluCl subtype, distinct from the homomeric receptor made of AVR-14B ($p < 0.001$; **Fig. 3D, Table 2**).

Noteworthy, for the homomeric Pun-AVR-14B receptor, application of high concentrations of glutamate only induced small currents. In addition, even with 100 mM glutamate ($n = 7$), the induced currents never reached a plateau value, suggesting that the receptor was not saturable. In sharp contrast, the co-injection of AVR-14B and GLC-2 led to the robust expression of a functional heteromeric receptor sensitive to a micromolar range of glutamate (**Fig. 3E**). The calculated EC_{50} was $13.6 \pm 1.6 \mu M$ ($n = 5$, **Fig. 3F, Table 2**).

In order to get new insight about the respective pharmacological properties of the heteromeric AVR-14B/GLC-2 GluCl subtypes from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens*, we investigated their sensitivity to a wide range of MLs available in the market (i.e. abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin, and selamectin). Representative currents of the two most potent MLs on receptor from each species are shown in **Fig. 4**. All the MLs tested acted as potent agonist on these receptors inducing their permanent activation. Receptor activation by MLs was not reversible and slower in comparison to the activation by glutamate. Emamectin was the most rapid agonist at these three receptors. Indeed, application of $1 \mu M$ emamectin induced a current corresponding to $78 \pm 7 \%$ ($n = 7$), $80 \pm 6 \%$ ($n = 7$) and $24 \pm 4 \%$ ($n = 6$) of the maximum current amplitude induced by glutamate for Cel-AVR-14B/GLC-2 (**Fig. 4B**), Bma-AVR-14B/GLC-2 (**Fig. 4D**) and Pun-AVR-14B/GLC-2 (**Fig. 4F**), respectively. However, the speed of receptor activation and the current amplitudes induced by 5 s application of MLs at $1 \mu M$ were not significantly different for most of the MLs.

GLC-2/GLC-3 from *C. elegans* and *P. univalens* forms a new functional GluCl subtype with remarkable pharmacological properties

In order to evaluate the ability of GLC-2 to combine with another GluCl subunit, GLC-2 from *C. elegans*, *B. malayi* or *P. univalens* were co-injected in the *Xenopus* oocytes with their respective GLC-3 counterpart.

As a preliminary set of experiment, putative homomeric channels made of GLC-3 show a low response to glutamate for *C. elegans* and *P. univalens* in contrast to *B. malayi*, which did not respond. Also, GLC-2 formed a functional homomeric receptor only for *C. elegans*. Interestingly, for *C. elegans*, Cel-GLC-2, Cel-GLC-3 and the combination of Cel-GLC-2/GLC-3 responded to glutamate application (**Fig. 2 & Fig. 5A**). Because the glutamate maximum effect for Cel-GLC-3 cannot be reached even with 30 mM glutamate application, the EC₅₀ has not been determined. However, for Cel-GLC-2 and Cel-GLC-2/GLC-3 the glutamate concentration-response curves were characterized by EC₅₀ of $214.6 \pm 13.1 \mu\text{M}$ (n = 5) and $46.8 \pm 3.7 \mu\text{M}$ (n = 5). The shift between these two EC₅₀ clearly demonstrated that GLC-2 and GLC-3 combined to form a new GluCl subtype with a higher affinity for glutamate than the homomeric receptors (p < 0.001 ; **Fig. 5B, Table 2**).

Secondly, the potential interaction between GLC-2 and GLC-3 from *B. malayi* and *P. univalens*, were evaluated as previously done. Interestingly, oocytes expressing the *B. malayi* receptors Bma-GLC-2, Bma-GLC-3 and Bma-GLC-2/GLC-3 did not respond to application of 1 mM glutamate (**Fig. 2**). On the contrary, GLC-2 and GLC-3 from *P. univalens*, which do not form highly glutamate sensitive homomeric receptor, can combine to form functional receptors (**Fig. 2 & Fig. 5C**). The Pun-GLC-2/GLC-3 combination showed an EC₅₀ of $120.2 \pm 5.7 \mu\text{M}$ (n = 21) while the EC₅₀ for Pun-GLC-3 is $1482 \pm 111 \mu\text{M}$ (n = 11). Comparison of the EC₅₀ clearly demonstrate that both GLC-2 and GLC-3 combine to form a new GluCl subtype in *P. univalens* (**Fig. 5D, Table 2**) which is a novel potential MLs' molecular target.

In order to decipher the effect of different MLs and to provide comparison elements on the heteromeric GLC-2/GLC-3 of *C. elegans* and *P. univalens*, we focused our attention on ivermectin, and moxidectin (used for *Parascaris sp. treatment*) and eprinomectin (used for clade V parasites on lactating animals). The representative current traces obtained after application of the two drugs are shown in **Fig. 6A** and **Fig. 6C** for Cel-GLC-2/GLC-3 and Pun-GLC-2/GLC-3, respectively. Cel-GLC-2/GLC-3 was activated by ivermectin, moxidectin and eprinomectin. The maximum current amplitude was induced by ivermectin with a current amplitude corresponding to $15 \pm 2 \%$ (n = 9) of the maximum response obtained with glutamate (**Fig. 6B**) which is very similar to the ivermectin effect on Cel-AVR-14B ($18 \pm 3 \%$, n = 6). Surprisingly, for *P. univalens*, none of the tested MLs induced a current (**Fig. 6D** and **Fig. S4A**) which is in the opposite of the agonist effect of MLs described on most GluCl subtypes with the striking exception of GLC-2. In order to confirm than the ivermectin application period do not have impact on its agonist effect, $1 \mu\text{M}$

ivermectin was perfused for a longer period (90 s) on Pun-GLC-2/GLC-3. Even with a long application period, ivermectin showed a weak agonist effect with a current amplitude corresponding to 3.56 ± 0.54 % ($n = 7$) of the maximum response obtained with glutamate (**Fig. S4B**). Because of the very weak ML's activity as agonist, we hypothesized that MLs could potentially act as antagonists or potentialize the effect of glutamate on Pun-GLC-2/GLC-3. To test the hypothesis, application of 100 μ M glutamate (corresponding approximately to the EC_{50}) before, during and after the addition of 1 μ M ivermectin (**Fig. 7A**) or moxidectin (**Fig. 7B**) were applied on the receptors. Both drugs potentialized the effect of glutamate. Current amplitudes in response to 100 μ M glutamate were increased by 45 ± 10 % ($n = 5$, $p < 0.05$; **Fig. 7C**) and 93 ± 19 % ($n = 8$, $p < 0.01$; **Fig. 7D**) when co-applied with ivermectin and moxidectin respectively. This effect was reversible for both ivermectin ($p < 0.05$) and moxidectin ($p < 0.001$). This is to our knowledge, the first report of a nematode GluCl weakly activated by MLs but potentialized by them, representing a novel receptor subtype with unique pharmacological properties.

Discussion

GluCl subunit diversity in nematodes

Macrocyclic lactones proved their efficacy against a large panel of parasitic nematodes in many host species of veterinary and human interest (9). The model nematode *C. elegans* were largely used as an expression system to identify molecular targets of MLs and to understand their universal mode of action in nematodes. MLs directly activate glutamate-gated chloride channels or potentiate their response to glutamate leading to irreversible channel opening, paralysis and elimination of the nematodes in infected hosts. *C. elegans* possess six distinct genes encoding for at least eight GluCl subunits (i.e. AVR-14A, AVR-14B, AVR-15A, AVR-15B, GLC-1, GLC-2, GLC-3 and GLC-4) (26,36,38,43–46). Among those subunit, with the exception of AVR-15 and GLC-1 only described in *C. elegans*, AVR-14A, AVR-14B and GLC-4 were found in distantly related nematode species from different phylogenetic clades including clade I, clade III and clade V (52). Also, GLC-2 and GLC-3 were found in nematodes from clades III and V. In this sens, AVR-14, GLC-2, GLC-3 and GLC-4 represent a core of GluCl that make them prime candidate to investigate the functional and pharmacological GluCl diversity in parasitic nematodes. Thus, it is tempting to hypothesize that such a conservation of GluCl subunit encoding genes could provide an explanation for the broad spectrum activity of MLs on nematodes.

In the present study, we identified a panel of functional homomeric and heteromeric GluCl channels in the free-living model nematode *C. elegans* as well as in *B. malayi* and *P. univalens*, two parasitic nematodes presenting a major impact for human and equine health. Among the *C. elegans* GluCl subunits, AVR-14B, AVR-15A/B, GLC-2 and GLC-3 are able to form functional homomeric channels when expressed in *Xenopus* oocytes (26,36,38,43,45). Noteworthy, whereas AVR-14B, AVR-15B, and GLC-2 form receptors responsive to glutamate in the μM range with elicited currents at the μA range, in contrast, AVR-15A and GLC-3 homomeric receptor respond to mM glutamate application resulting in small currents at the nA range. In other clade V nematode species such as *H. contortus* (47,50) and *C. oncophora* (27) homomeric glutamate sensitive channels made of AVR-14B or GLC-2 have also been described, suggesting that such recombinant homomeric GluCl channels could also been obtained from other parasitic nematode species. In sharp contrast, in the present study we showed that none of the GluCl subunits from the parasites *B. malayi* nor *P. univalens* (i.e. AVR-14B, GLC-2, GLC-3 and GLC-4) gave rise to robust functional channel when expressed in the *Xenopus* oocytes (i.e. no glutamate elicited current, or small current at the nA range elicited by mM range glutamate). For the later, this could raise the question of the existence of such homomeric receptors *in vivo* and suggest the need for additional subunits to form functional receptor responsive to physiologically

relevant glutamate concentrations (glutamate EC₅₀ of 166 μ M for pharynx muscle depolarization for *C. elegans*) (53–55).

Highly conserved nematode GluCl subunits play a pivotal role in heteromeric receptors composition

In the present study, our hypothesis that GLC-2 could combine with other GluCl subunits was supported by the evidence that GLC-2 combine with GLC-1 (36) and AVR-15 (43) in *C. elegans* and with AVR-14B in *H. contortus* (50) and *C. oncophora* (27). Interestingly, the three heteromeric GluCl described in nematodes all include the GLC-2 subunit (27,36,43,50). Because the *C. elegans* AVR-14, GLC-2, GLC-3 and GLC-4 subunits has been shown to be expressed in pharyngeal neurons (56,57), we investigated potential heteromeric channels made of a combination of these subunits using the *Xenopus* oocytes as an expression system.

For all three species, combination of AVR-14B/GLC-2 led to a robust expression of glutamate sensitive receptors. The drastic reduction of the glutamate EC₅₀ of AVR-14B/GLC-2 of a factor 4 to more than 23 in comparison with their respective homomeric receptor counterparts strongly support the association of the two distinct subunits into functional heteromeric receptors. Surprisingly, the EC₅₀ calculated for Cel-AVR-14B and Cel-GLC-2 were very low compare to their first description with EC₅₀ of $2200 \pm 120 \mu\text{M}$ (28) and $1360 \pm 50 \mu\text{M}$ (36), respectively. Whereas the GLC-2 amino acid sequence obtained in the present study was similar to the one reported by Cully et al (36), our AVR-14B sequence differs by one amino acid in the second transmembrane domain at position 305 (Ser 305) compared to the sequence found by McCavera et al, (Thr 305) (28). The Ser 305 of Cel-AVR-14B correspond to the Ser 265 of Cel-GLC-1, which were shown to be involved in the channel pore (41). This mutation S305T may explain such differences in glutamate EC₅₀.

Subsequently, we described for the first time that the combination GLC-2/GLC-3 formed a novel GluCl subtype sensitive to μM glutamate for *C. elegans* and *P. univalens* but surprisingly not for *B. malayi*. In order to explain the absence of functional GLC-2/GLC-3 for *B. malayi*, we first speculated that non-functional Bma-GLC-3 could be responsible for the failure to get the predicted GLC-2/GLC-3 receptor as Bma-GLC-2 has proven to be functional in the obligate heteromeric channel including AVR-14B. However, the successfully expression of a functional chimeric receptor made of Pun-GLC-2 and Bma-GLC-3 (**Fig. S5**, n = 12), confirmed that Bma-GLC-3 was a functional subunit. Therefore, we could only speculate that 1) additional subunits combining to GLC-3 alone or GLC-2/GLC-3 of *B. malayi* are required to form functional receptors, 2) as reported for the functional expression of

some nAChR subtype, the addition of some ancillary proteins (58,59) could be necessary for some nematode GluCl expression in the *Xenopus* oocytes.

In summary, our results highlight that subunit combination is critical for clade III parasites to form functional glutamate-sensitive receptor in *Xenopus* oocyte expression system whereas it is increasing the GluCl receptor diversity in clade V nematode.

New insights about macrocyclic lactones mode of action

There was to our knowledge no functional characterization of a wide range of MLs on their pharmacological targets. Here, the identification of novel functional GluCl from three distinct nematode species opened the way for detailed pharmacological characterization to decipher their relative sensitivity to different MLs. In accordance with previous studies performed on AVR-14B/GLC-2 of *H. contortus* (50) and *C. oncophora* (27), we showed that AVR-14B/GLC-2 from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens* were sensitive to ivermectin and moxidectin corresponding to the only two MLs with marketed authorization in human health (60) and the most used in equine health with abamectin and doramectin (61).

In addition, we showed that this subtype is also sensitive to a wide range of MLs including abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin and selamectin. Presently, only ivermectin have marketed authorization for a wide variety of hosts and parasites. Others MLs have more specific marketed authorization such as emamectin, which is mostly used as insecticide in veterinarian aquaculture as well as in terrestrial agriculture (62). Interestingly, the presented work highlighted that emamectin seems the most efficient agonist of the AVR-14B/GLC-2 receptors in the three species compared to the currently used MLs against *B. malayi* and *Parascaris sp.* However, whether the high potency of emamectin on AVR-14B/GLC-2 could be correlated or not with a better efficacy of the drug *in vivo* remain to be established. Importantly, this also raise the question of the relative contribution of the different GluCl subtypes in MLs sensitivity. For exemple, in case of ivermectin resistance, moxidectin remains effective to treat lambs infected with *H. contortus* (80) suggesting that both molecules could preferentially activate distinct pharmacological targets. However, the agonist properties of the MLs on these receptors expressed in oocytes do not explain their different anthelmintic efficacy on different species *in vivo* (63,64) showing the limit of the model and highlighting the importance of combining different approach to study MLs mode of action.

Because stable transformation remains an elusive goal for numerous parasitic nematode species (65,66), RNAi experiments could represent an attractive alternative to investigate the respective role of the distinct GluCl subtype

in MLs susceptibility (67). Recently RNAi has been successfully used in *B. malayi* to invalidate the expression of nAChR (68) and SLO-1 subunits (69). Undoubtedly, such an approach combined with phenotypic assays (70) or the recently developed *in vivo* imaging system (IVIS) optimized to study *B. malayi* on a gerbil model (71) would represent a major opportunity to investigate in more details the MLs mode of action.

Distinct pharmacology between *C. elegans* and parasites

In the present study, we reported that GLC-2/GLC-3 of *C. elegans* and *P. univalens* form functional glutamate-sensitive receptors but didn't shared common pharmacological property. Indeed, whereas ivermectin, moxidectin and eprinomectin act as agonist on Cel-GLC-2/GLC-3, in contrast MLs didn't act on Pun-GLC-2/GLC-3 receptors as positive allosteric modulators but ivermectin and moxidectin had a reversible glutamate potentializing effect at the same concentration. Such a pharmacological property appears to be rare in GluClS of invertebrate and make this novel subtype a unique pharmacological target that open the way for drug screening to find new therapeutic molecules.

In conclusion, this study highlighted the importance of *C. elegans* as a valuable tool for parasitic GluCl discovery but also highlighted its limits for the functional and pharmacological predictability with the clade III nematode parasites *B. malayi* and *P. univalens*. Indeed, we highlight that the core set of GluCl subunits (AVR-14, GLC-2, GLC-3 and GLC-4) didn't form functional homomeric receptors in *Xenopus* oocytes for *B. malayi* and *P. univalens* or have no reliable expression in contrast with *C. elegans* for which most of the GluCl subunit form homomeric functional channels. We found that AVR-14B/GLC-2 is sensitive to a wide range of MLs and is common in nematodes from clade III and V. GLC-2/GLC-3 subtype showed drastic differential pharmacological properties for *C. elegans* and *P. univalens* and wasn't found functional for *B. malayi*. Tested MLs acted as agonists on Cel-GLC-2/GLC-3 whereas they had a glutamate potentializing effect on Pun-GLC-2/GLC-3. We provided new insight about the GluCl diversity and highlighted the importance of GLC-2 as a core subunit in *C. elegans* and in the clade III nematodes *B. malayi* and *P. univalens*. This work open the way for the rational use of MLs and potentially new drug discovery on novel GluCl subtypes.

Material and Methods

A. Sample supply

C. elegans used in this study are Bristol N2 wild-type strain worms supplied by the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), St. Paul, MN, USA, which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). *B. malayi* microfilariae were supplied by NIH/NIAID Filariasis Research Reagent Resource Center, University of Georgia, Athens, GA, USA (www.filariasiscenter.org) Adults *P. univalens* were collected in faeces of naturally infested foals from UEPAO (Experimental Unit of Orfrasière Animal Physiology, INRA Centre Val de Loire, Nouzilly, 37380, France) 50 h after treatment with ivermectin. All samples were stored at -80 °C in RNA lysis solution (Ambion) before used.

B. Karyotyping of *Parascaris* sp samples

Parascaris equorum and *Parascaris univalens* are the two *Parascaris* spp. described as morphologically identical. They can be discriminated by karyotyping as *P. univalens* has one pair of chromosome while *P. equorum* has two pairs (72). We confirmed the species status by karyotyping *Parascaris* eggs from foals in Nouzilly, France. Ascarid eggs were extracted from a pool of faecal samples from four foals from the UEPAO. Feces were mixed with tap water and deposited on two sieves stacked in order of size (125 µm on the top and 63 µm on the bottom, respectively). Eggs were collected and washed with a large amount of tap water on the 60 µm sieve. Karyotyping was performed as described previously (73). Briefly, eggs were decorticated by three washing steps with 2% sodium hypochlorite in 16.5% sodium chloride, and subsequently by six washing steps with cold tap water. Then, eggs were briefly centrifugated and split in pool of 1000-1500 eggs which were incubated for 1.5 h, 2 h or 3 h at 37 °C for the first or second embryonic division to occur. Eggs were fixed with a mixture of methanol, acetic acid and chloroform (6:3:1) during 1 h, then washed twice with tap water. Approximately 500 eggs were placed between a slide and a coverslip and were crushed by pressing hard manually 1 min on the slides and then frozen in liquid nitrogen for 1 min. The coverslip was removed and let the glass air dried. Dried slides and first coverslips were mounted with new coverslips and slides respectively, using ProLong® Diamond Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies). Six mounted slides were incubated 24 h at room temperature in the dark and examined using a fluorescent microscope (Nikon Eclipse E600). As expected, the widespread species *P. univalens* was identified as the only species present in the infected foals since all eggs had a single pair of chromosomes (**Fig. S1**).

C. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from a pool of adults for *C. elegans* and from a pool of larvae for *B. malayi*. For *Parascaris sp.*, total RNA was extracted from the head of one worm, including pharynx. Total RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. cDNA synthesis was performed with 0.5-5 µg of total RNA using the Maxima H minus Reverse Transcriptase kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's recommendations.

D. Identification and cloning of full-length GluCl subunit coding sequences from nematodes

PCR amplification were performed according to the manufacturer's recommendations with the Phusion High Fidelity Polymerase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) using cDNA as template. Full-length coding sequences were cloned into pTB-207 and RACE-PCR product were cloned into pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA). Eurofins Genomics (Luxembourg, Luxembourg) sequenced all constructs. Sequences of Cel-AVR-14B (CAA04170), Cel-GLC-2 (AAA50786) and Cel-GLC-3 (CAB51708) from *C. elegans* were available on Genbank as well as Pun-AVR-14B (ABK20343) subunit coding sequence from *P. univalens*. Using the GluCl subunit sequences of *C. elegans*, *Haemonchus contortus* and Pun-AVR-14B as queries, tBLASTn searches in NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and WormbaseParasite (<https://parasite.wormbase.org/Tools/Blast?db=core>) allowed the identification of full-length coding sequence of GluCl subunits from *B. malayi* (Bma-GLC-2 : XM_001893073.1 ; Bma-GLC-4 : XM_001900205.1 ; Bma-AVR-14B : supercontig:Bmal-4.0:Bm_v4_Chr3_scaffold_001:1374074:1388079:1 ; Bma-GLC-3 : Bmal-4.0:Bm_v4_Chr4_scaffold_001:1513094:1542759:-1) and partial sequences of GluCl subunits from *P. univalens* (Pun-GLC-2 : NODE_2545302 ; Pun-GLC-3 : NODE_2129897 and NODE_2250308 ; Pun-GLC-4 : NODE_1817943, NODE_2402242 and NODE_2418647). Primers designed for RACE PCR and to amplify full-length coding sequences of each subunit are indicated in **Tables S1-3**. For GluCl subunits of *P. univalens*, the corresponding 5' and 3' cDNA ends were obtained by nested RACE-PCR experiments already described in previous study (59). After identification of the 5' and 3' ends, two pairs of new primers per subunit were designed to amplify the full-length coding sequence of all GluCl subunits by nested PCR with the proofreading Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Then, PCR products were cloned into the transcription vector pTB-207 (74) using the In-Fusion HD Cloning kit (Clontech) as described previously (75). Recombinant constructs were purified using EZNA Plasmid DNA Mini kit (Omega Bio-Tek) and sequence-checked (Eurofins Genomics). The novel complete coding sequences of Bma-AVR-14B, Bma-GLC-2, Bma-GLC-3, Bma-GLC-4, Pun-AVR-14B, Pun-GLC-2, Pun-GLC-3 and Pun-GLC-4 were deposited to Genbank. Constructs were linearized with MspI, PaeI or PacI restriction enzymes (ThermoFisher)

depending on the construct. Linearized plasmids were used as DNA templates for cRNA synthesis using the mMessage mMachine T7 transcription kit (Ambion). cRNAs were precipitated with lithium chloride and were resuspended in a suitable volume of RNase-free water and stored at -20 °C before use.

E. Sequence analysis and phylogeny

Predictions of signal peptides and transmembrane domains were performed with SignalP4.0 (76) and Simple Modular Architecture Research Tool (77). Deduced amino-acid sequences of GLCs from *B. malayi*, *C. elegans* and *P. univalens* were aligned using the MUSCLE algorithm and further processed with GENEDOC (IUBio). Percentage of identity between deduced amino acid of mature protein without peptide signal were obtained with EBI Global Alignment EMBOSS Needle (78). All the sequences were manipulated with « The Sequence Manipulation Suite » (<https://www.bioinformatics.org/sms/>). Restriction enzyme sites were deduced from NEBcutter (<http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/>). The phylogenetic distant tree was constructed by the SeaView software (79) using BioNJ (Poisson) parameters and bootstraps values were calculated on 1000 replications The tree was modified by FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

The sequences used in this study are available on GenBank under the followed accession numbers : *Brugia malayi* (Bma) : AVR-14B (MW196269), GLC-2 (MW196266), GLC-3 (MW196267), GLC-4 (MW196268); *Caenorhabditis elegans* (Cel) : AVR-14A (AAC25481), AVR-14B (MW196270), AVR-15A (CAA04171), AVR-15B (CAA04170), GLC-1 (AAA50785), GLC-2 (AAA50786), GLC-3 (CAB51708), GLC-4 (NP_495489.2), UNC-49B1 (AAD42383); *Haemonchus contortus* (Hco) : AVR-14A (CAA74622), AVR-14B (CAA74623), GLC-2 (CAA70929), GLC-4 (ABV68894), GLC-5 (AAD13405); *Parascaris univalens* (Pun): AVR-14B (MW187941), GLC-2 (MW187938), GLC-3 (MW187939), GLC-4 (MW187940) and GLC-5 (QBZ81966).

F. Electrophysiological recording and data analysis in *Xenopus laevis* oocytes

Defolliculated *Xenopus laevis* oocytes were purchased from Ecocyte Bioscience (Germany) and maintained in incubation solution (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂.2H₂O, 1 mM MgCl₂.6H₂O, 5 mM HEPES, 2.5 mM C₃H₃NaO₃, pH 7.5 supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 19 °C. Using the Drummond nanoject II microinjector, each oocyte were microinjected with 72 ng of cRNA when subunits are expressed singly or with 50 ng for each subunit when expressed in combination (1 :1 ratio). Three to six days after cRNA microinjection, two-electrode voltage-clamp recordings were performed with an Oocyte clamp OC-725C

amplifier (Warner instrument) at a holding potential of -80 mV to assess the expression of the GluCl channels. Currents were recorded and analyzed using the pCLAMP 10.4 package (Molecular Devices).

Dose responses relationships for glutamate were carried out by challenging oocytes with 5-10 s applications of increasing concentration of glutamate (between 1 μ M to 30 mM depending on the receptor) with 2 min washing steps with Ringer solution between each application. The peak current values were normalized to the maximum response obtained with a saturated concentration of glutamate. The concentration of agonist required to mediate 50% of the maximum response (EC_{50}) and the Hill coefficient (nH) were determined and compared using non-linear regression on normalized data with R Studio using the *drc* package v3.0-1 (80). Results are shown as mean $\pm$ SEM.

Comparison of the MLs effect on a receptors were performed as described previously (27,49). Briefly, 1 mM glutamate was first perfused on the oocytes as a reference peak current (maximum response) before application of a ML 1 μ M for 5 s. Current responses were normalized to the maximum current amplitude obtained with 1 mM glutamate. For Pun-GLC-2/GLC-3, the potentializing effect of MLs was evaluated by a first application of each MLs alone for 5 s, followed by the co-application with 100 μ M glutamate for 5 s. The observed responses were normalized to the response induced by 100 μ M glutamate (corresponding approximately to the glutamate EC_{50} for Pun-GLC-2/GLC-3) alone performed prior to challenging with the ML. In order to investigate the reversibility of the potentializing effect of the MLs, 100 μ M glutamate was applied after 2 min washing. Statistical analysis were performed using Kruskal-Wallis (Wilcoxon test) with Bonferroni adjustments to compared glutamate and MLs current amplitudes.

G. Chemicals

Glutamate, piperazine and the macrocyclic lactones (selamectin, ivermectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, abamectin and moxidectin) were purchased from Sigma-Aldrich. Macrocyclic lactones were first dissolved in DMSO as 10 mM and then diluted in recording solution to the required concentration with a final concentration of DMSO which not exceed 1 %. Glutamate was directly prepared in recording solution.

Acknowledgments

We thank Adrian Wolstenholme group from the Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA, 30602, USA for providing the *B. malayi* microfilariae. We thank the group of UEPAO (Experimental Unit of Orfrasière Animal Physiology, INRA Centre Val de Loire, Nouzilly, 37380,

France) for providing *P. univalens* eggs and adults. We wish to acknowledge A. Wolstenholme and B. Reaves for critical review of the manuscript.

Funding

This study was supported by the Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) to EC, CLC and CN (<https://www.infectiologie-regioncentre.fr/>). NL is the grateful recipient of a PhD grant from the Animal Health Division of INRAE and from the Région Centre-Val de Loire, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Figures legends

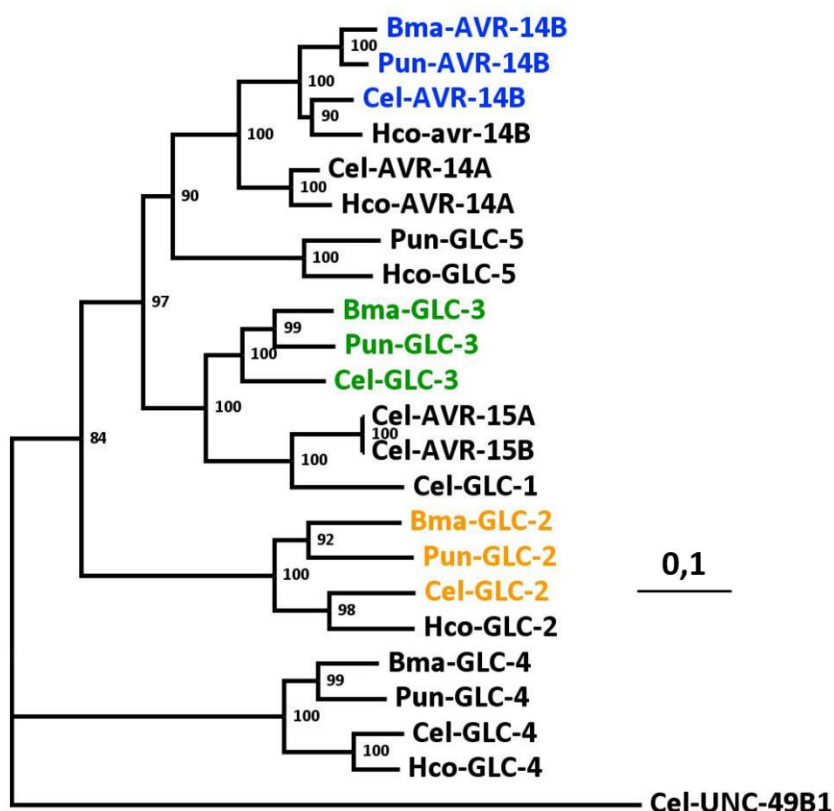


Fig. 1: Distance tree (BioNJ, Poisson) of GluCl protein sequences from the nematodes *B. malayi* (Bma), *C. elegans* (Cel), *H. contortus* (Hco) and *P. univalens* (Pun). The bootstrap values are indicated next to each branch. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per amino acid. Scale bar represents the number of substitutions per site. Accession numbers for the sequences used in this phylogenetic analysis are provided in the Methods sections. Sequences of AVR-14B, GLC2 and GLC-3 from *B. malayi*, *C. elegans* and *P. univalens* are highlight in blue, yellow and green respectively. The GABA receptor subunit UNC-49B1 from *C. elegans* was used as an outgroup.

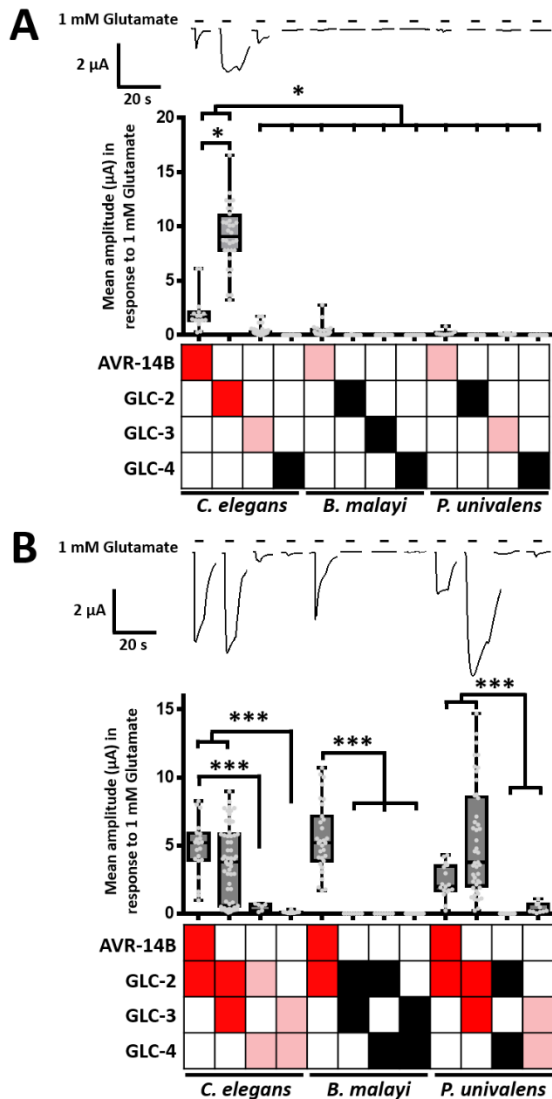


Fig. 2: Functional expression of GluCl subunits from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens* in *Xenopus laevis* oocytes.

Representative currents with mean current amplitude in response to 1 mM glutamate application on *Xenopus* oocytes expressing homomeric (A) or heteromeric (B) receptors for *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens*. Glutamate application times are indicated by the black bars. Boxplots represent mean $\pm$ SEM, Kruskal-Wallis, *** $p < 0.001$. Dark red boxes show effective combinations that led to robust expression of receptors responding to 1 mM glutamate with peak current in μ A range. Light red boxes correspond to combinations which respond to 1 mM glutamate with small currents in nA range. Black boxes correspond to combinations that not responded to 1 mM glutamate.

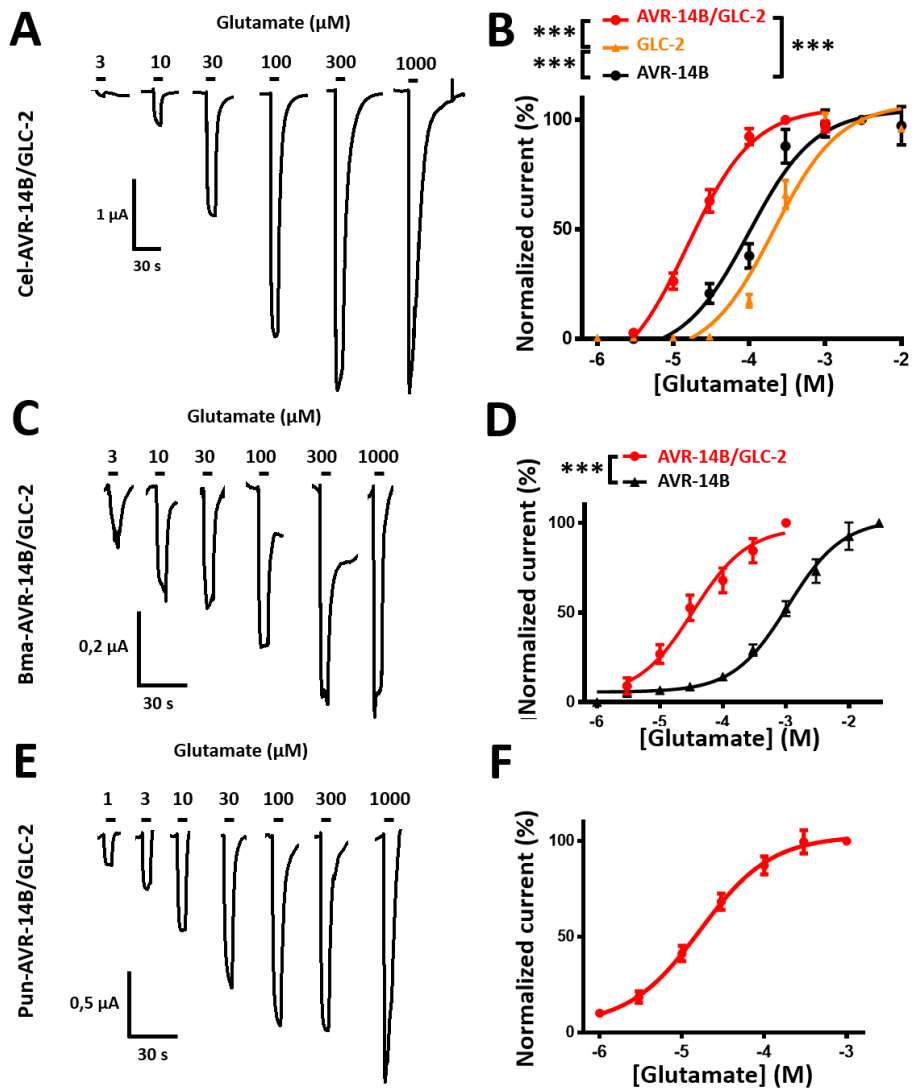


Fig. 3: Functional characterization of AVR-14B/GLC-2 from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens*.

- Representative current traces of Cel-AVR-14B/GLC-2 expressed in *Xenopus* oocytes in response to the application of an increasing concentration of glutamate (3-1000 μM). Glutamate application periods are indicated by the black bars.
- Glutamate concentration-response curve for Cel-AVR-14B, Cel-GLC-2 and the combination Cel-AVR-14B/GLC-2 (mean $\pm$ SEM, $n = 5-8$). Current amplitudes were normalized to the maximal effect obtained with a saturating glutamate concentration, Kruskal-Wallis *** $p < 0.001$.
- Representative current traces of Bma-AVR-14B/GLC-2 expressed in *Xenopus* oocytes in response to the application of an increasing concentration of glutamate (3-1000 μM). Glutamate application periods are indicated by the black bars.

- D. Glutamate concentration-response curve for Bma-AVR-14B and the combination Bma-AVR-14B/GLC-2 (mean $\pm$ SEM, $n = 5$). Current amplitudes were normalized to the maximal effect obtained with a saturating glutamate concentration, Kruskal-Wallis*** $p < 0.001$.
- E. Representative current traces of Pun-AVR-14B/GLC-2 expressed in *Xenopus* oocytes in response to the application of an increasing concentration of glutamate (1-1000 μ M). Glutamate application periods are indicated by the black bars.
- F. Glutamate concentration-response curve for Pun-AVR-14B/GLC-2 (mean $\pm$ SEM, $n = 5$). Current amplitudes were normalized to the maximal effect obtained with a saturating glutamate concentration.

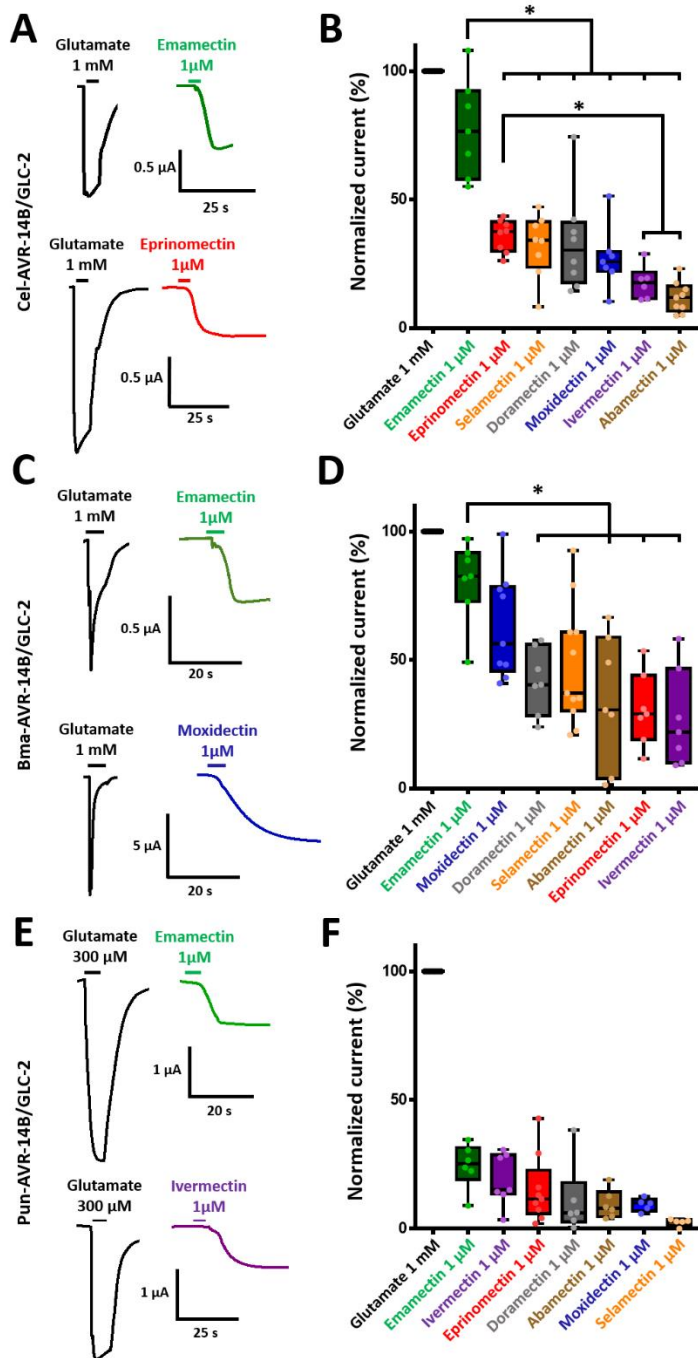


Fig. 4: Effects of marketed macrocyclic lactones on AVR-14B/GLC-2 from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens*.

A. Representative recording traces from a single oocyte injected with AVR-14B and GLC-2 of *C. elegans* induced by the two most potent activators, emamectin and eprinomectin after a first application of 1 mM glutamate. Application time are indicated by the black bars.

B. Comparison of macrocyclic lactones effects at 1 μ M after 5 s application on Cel-AVR-14B/GLC-2. All responses are normalized to the maximum responses obtained with glutamate at 1 mM (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, * $p < 0.05$).

C. Representative current traces from a single oocyte injected with AVR-14B and GLC-2 of *B. malayi* induced by the two most potent activators, emamectin and moxidectin after a first application of 1 mM glutamate. Application time are indicated by the black bars.

D. Comparison of macrocyclic lactones effects at 1 μ M after 5 s application on Bma-AVR-14B/GLC-2. All responses are normalized to the maximum responses obtained with glutamate at 1 mM (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, * $p < 0.05$).

E. Representative current traces from a single oocyte injected with AVR-14B and GLC-2 of *P. univalens* induced by the two most potent activators, emamectin and ivermectin after a first application of 1 mM glutamate. Application time are indicated by the black bars.

F. Comparison of macrocyclic lactones effects at 1 μ M after 5 s application on Pun-AVR-14B/GLC-2. All responses are normalized to the maximum responses obtained with glutamate at 1 mM (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, * $p < 0.05$).

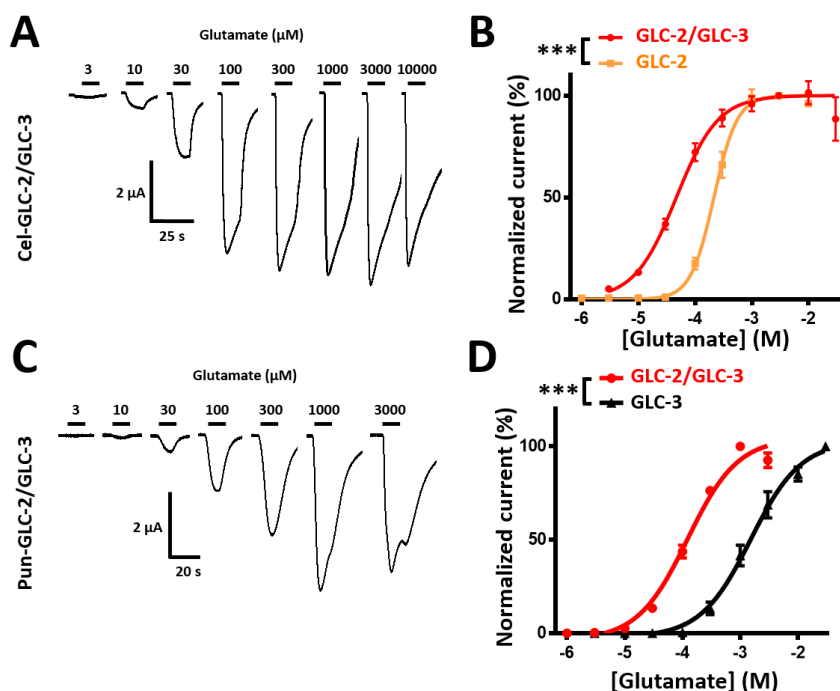


Fig. 5: Pharmacological characterization of GLC-2/GLC-3 from *C. elegans* and *P. univalens*.

- Representative current traces of Cel-GLC-2/GLC-3 expressed in *Xenopus* oocytes in response to an increasing concentration of glutamate (3-10000 μM). Application times are indicated by the black bars.
- Glutamate concentration response curve on Cel-GLC-2 and on the combination Cel-GLC-2/GLC-3 (mean $\pm$ SEM, $n = 5$). Current amplitudes were normalized to the maximal effect with glutamate (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, *** $p < 0.001$).
- Representative current traces of Pun-GLC-2/GLC-3 expressed in *Xenopus* oocytes in response to an increasing concentration of glutamate (3-3000 μM). Application times are indicated by the black bars.
- Glutamate concentration response curve on Pun-GLC-3 and on the combination Pun-GLC-2/GLC-3 (mean $\pm$ SEM, $n = 11-21$). Current amplitudes were normalized to the maximal effect with glutamate (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, *** $p < 0.001$).

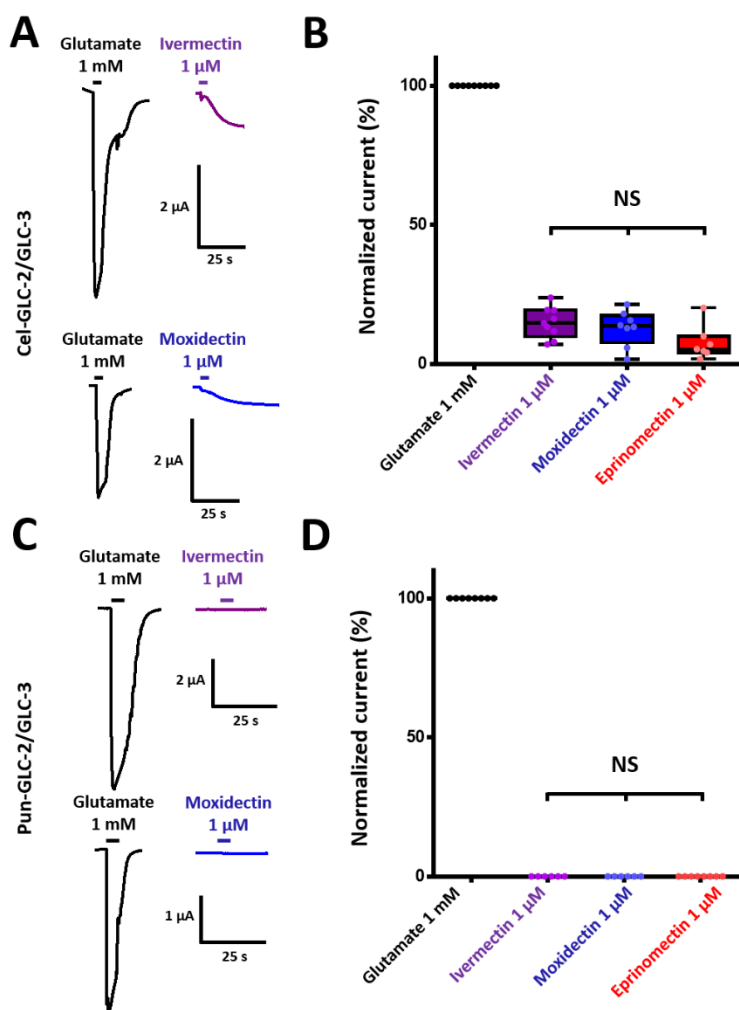


Fig. 6: Pharmacological characterization of GLC-2/GLC-3 from *C. elegans* and *P. univalens*.

- A. Representative current traces induced by some macrocyclic lactones (ivermectin, moxidectin and eprinomectin) on Cel-GLC-2/GLC-3. Application time are indicated by the black bars.
- B. Comparison of some macrocyclic lactones effects at 1 μM after 5 s application on Cel-GLC-2/GLC-3. All responses are normalized to the maximum responses obtained with glutamate at 1 mM (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, NS = Not significative)
- C. Representative current traces induced by some macrocyclic lactones (ivermectin, moxidectin and eprinomectin) on Pun-GLC-2/GLC-3. Application time are indicated by the black bars.
- D. Comparison of some macrocyclic lactones effects at 1 μM after 5 s application on Pun-GLC-2/GLC-3. All responses are normalized to the maximum responses obtained with glutamate at 1 mM (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, NS = Not significative).

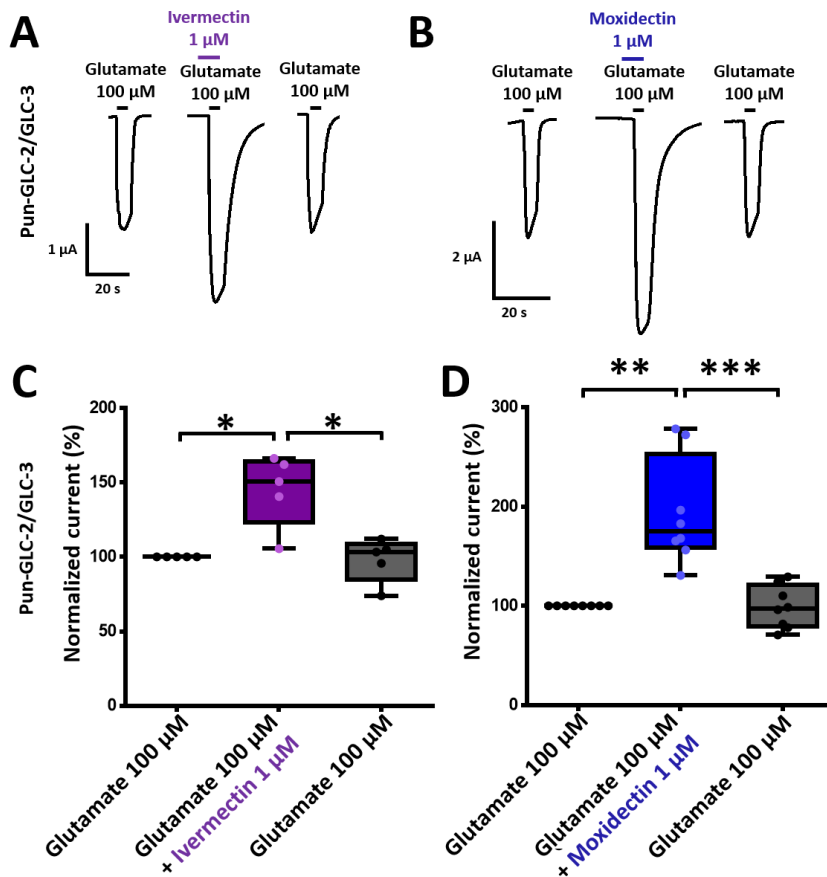


Fig. 7: Modulation of glutamate effect by ivermectin and moxidectin on GLC-2/GLC-3 from *P. univalens*.

A-B. Representative current traces induced by glutamate 100 μ M followed by a coapplication of ivermectin 1 μ M (**A**) or moxidectin 1 μ M (**B**) with glutamate 100 μ M. Application time are indicated by the black bars.

C. Box plot of the potentializing effect of ivermectin on Pun-GLC-2/GLC-3 normalized and compared with the response to 100 μ M glutamate (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, * p < 0.05).

D. Box plot (mean $\pm$ SEM, n = 8) of the potentializing effect of moxidectin on Pun-GLC-2/GLC-3 normalized and compared with the response to 100 μ M glutamate (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

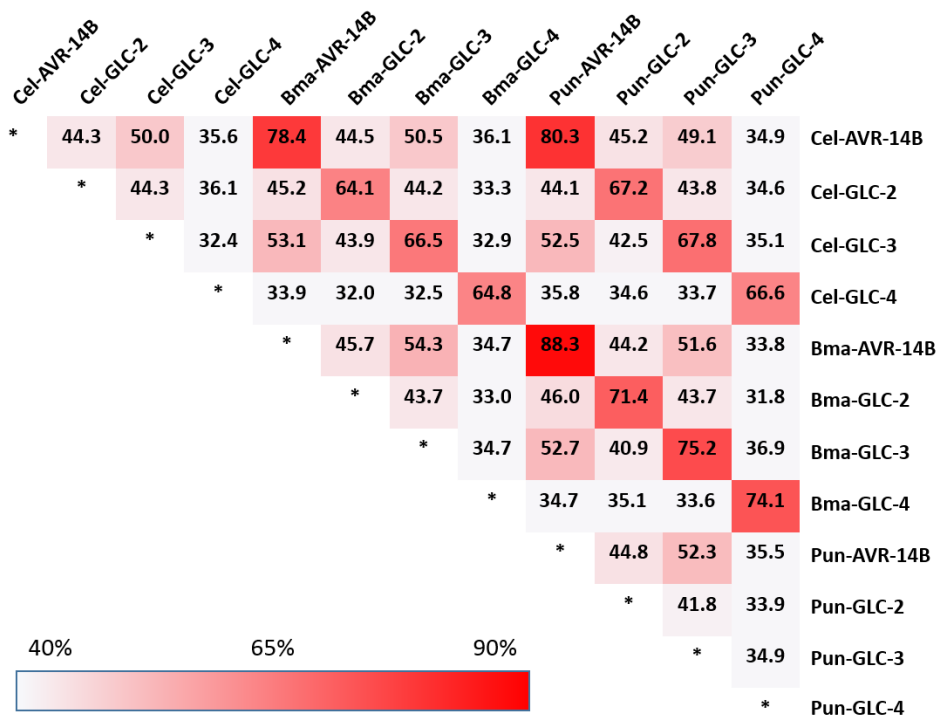


Table 1: Percentage amino acid sequence identity between GluClIs of *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens*

Deduced amino acid sequence of mature protein without signal peptide of AVR-14B, GLC-2, GLC-3 and GLC-4 from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens* were pairwise aligned. Darker red correspond to a higher percentage of identity while lighter red correspond to a lower identity percentage.

Receptors	Glutamate			% of glutamate response with 1 μ M MLs for 5 s or EC50 when determined elsewhere							
	I _{max} (μ A)	EC ₅₀ (μ M)	Hill coefficient	Abamectin	Doramectin	Eprinomectin	Emamectin	Ivermectin	Moxidectin	Selamectin	Références
Hco-AVR-14B	ND	28	1.9 +/- 0.3	ND	ND	ND	ND	22 +/- 3 nM	ND	ND	Atif et al, 2019
Hco-GLC-2	ND	394	1.5 +/- 0.1	ND	ND	ND	ND	> 10 μ M	ND	ND	Atif et al, 2019
Hco-AVR-14B/GLC-2	ND	40	1.7 +/- 0.1	ND	ND	ND	ND	86 +/-14 nM	ND	ND	Atif et al, 2019
Con-AVR-14B	5.9 +/- 0.41	29.7 +/- 4	2.4 +/- 0.21	ND	ND	ND	ND	500 +/- 120 nM	200 +/- 60 nM	ND	Njue et al, 2004
Con-GLC-2	0.3 +/- 0.01	185.6 +/- 24.9	2.2 +/- 0.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Njue et al, 2004
Con-AVR-14B/GLC-2	ND	13.4 +/- 2.5	1.9 +/- 0.28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Njue et al, 2004
Cel-AVR-14B	2.1 +/- 0.4	112.3 +/- 13 2200 +/- 120	2.6 +/- 0.7 0.72 +/- 0.08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	McCavera et al, 2009
Cel-AVR-15a	ND	2000 +/- 300	1.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Dent et al, 1997
Cel-AVR-15b	5.7 +/- 0.5	208.3	2.1	ND	ND	ND	ND	107 nM	ND	ND	Vassilatis et al, 1997
Cel-GLC-1	No currents							140 +/- 15 nM			Cully et al, 1994
Cel-GLC-2	9.1 +/- 0.5	214.6 +/- 13.1 380 +/- 20	2.2 +/- 0.3 1.9 +/- 0.2	ND	ND	ND	ND	> 1 μ M	ND	ND	Cully et al, 1994
Cel-GLC-3	0.29 +/- 0.05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	400 nM	ND	ND	Horoszok et al, 2001
Cel-GLC-4	No currents (n = 13)										
Cel-AVR-14B/GLC-2	4.8 +/- 0.4	20.5 +/- 1.3	1.4 +/- 0.3	11 +/- 2	33 +/- 7	36 +/- 2	61 +/- 15	18 +/- 3	27 +/- 5	32 +/- 4	
Cel-AVR-15b/GLC-2	3.36 +/- 0.34	62	2.4	ND	ND	ND	ND	103 nM	ND	ND	Vassilatis et al, 1997
Cel-GLC-1/GLC-2	ND	1360 +/- 50	1.7 +/- 0.1	ND	ND	ND	ND	190 +/- 7 nM	ND	ND	Cully et al, 1994
Cel-GLC-2/GLC-3	3.7 +/- 0.4	46.8 +/- 3.7	1.3 +/- 0.2	ND	ND	8 +/- 2	ND	15 +/- 2	13 +/- 2	ND	
Cel-GLC-2/GLC-4	0.49 +/- 0.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Cel-GLC-3/GLC-4	0.11 +/- 0.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Bma-AVR-14B	0.41 +/- 0.13	758.9 +/- 82	0.8 +/- 0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Bma-GLC-2	No currents (n = 11)										
Bma-GLC-3	No currents (n = 14)										
Bma-GLC-4	No currents (n = 13)										
Bma-AVR-14B/GLC-2	5.6 +/- 0.4	32.5 +/- 5.1	0.5 +/- 0.3	75 +/- 19	42 +/- 5	31 +/- 5	81 +/- 6	17 +/- 5	63 +/- 7	48 +/- 7	
Bma-GLC-2/GLC-3	No currents (n = 8)										
Bma-GLC-2/GLC-4	No currents (n = 8)										
Bma-GLC-3/GLC-4	No currents (n = 13)										
Pun-AVR-14B	0.20 +/- 0.08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Pun-GLC-2	No currents (n = 11)										
Pun-GLC-3	0.08 +/- 0.01	1482 +/- 111	1.5 +/- 0.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Pun-GLC-4	No currents (n = 12)										
Pun-AVR-14B/GLC-2	2.3 +/- 0.3	13.6 +/- 1.6	1.0 +/- 0.2	9 +/- 2	11 +/- 6	15 +/- 4	24 +/- 4	19 +/- 4	9 +/- 1	2 +/- 1	
Pun-GLC-2/GLC-3	5.3 +/- 0.6	120.2 +/- 5.7	1.4 +/- 0.1	0	0	0	1 +/- 1	0	0	0	
Pun-GLC-2/GLC-4	No currents (n = 11)										
Pun-GLC-3/GLC-4	0.38 +/- 0.11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

Table 2: Effect of glutamate and macrocyclic lactones on GluClIs from *C. elegans*, *B. malayi* and *P. univalens* expressed in *Xenopus* oocytes.

The table shows for each receptors its maximum current amplitude (I_{max}), its glutamate EC₅₀ with Hill coefficient and its response 1 μ M of macrocyclic lactones applied for 5 seconds and EC₅₀ when available. Data corresponded to mean +/- SEM of more than 5 oocytes. Results determined elsewhere are wrote in blue. ND = Not determined.

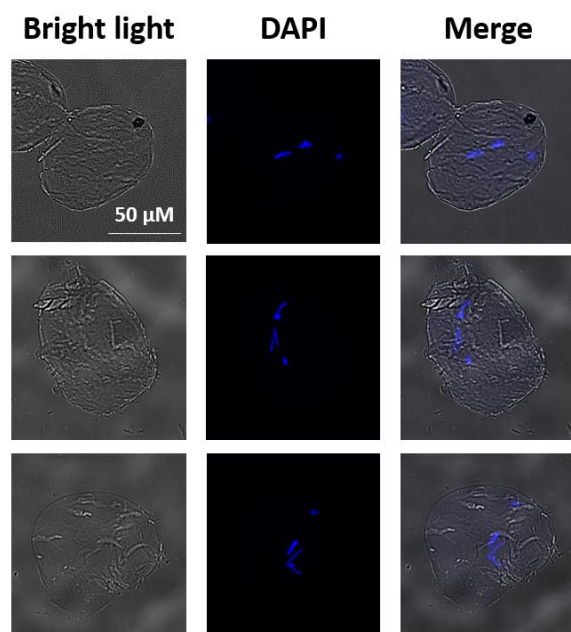


Figure S1 : Karyotype of *Parascaris univalens* from France.

Eggs with DAPI-stained during the first mitotic division showed a single pair of chromosomes representative of *Parascaris univalens* (x400).

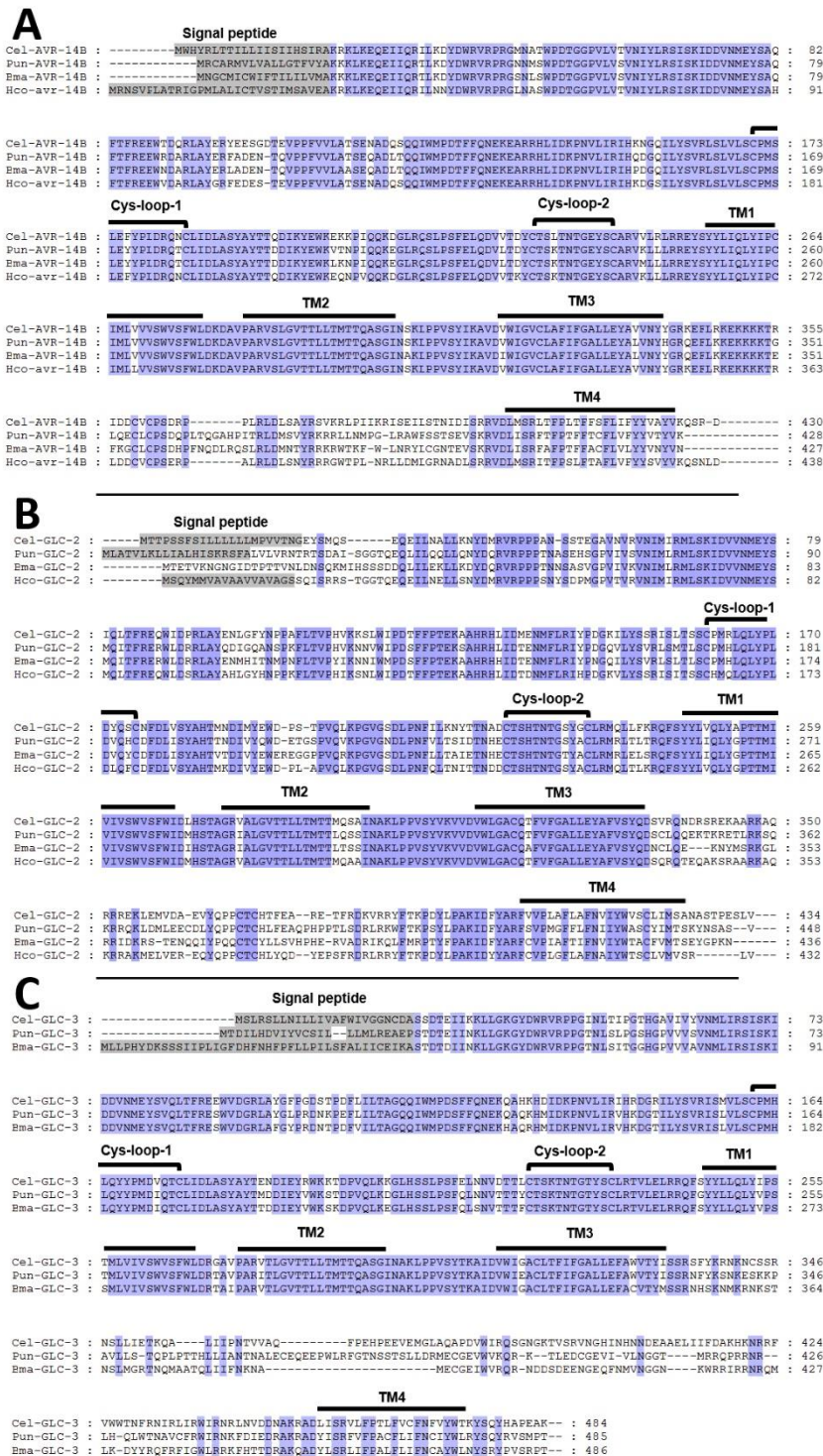


Fig. S2: Amino-acid alignments of AVR-14B (A), GLC-2 (B) and GLC-3 (C) subunit sequences from the four nematode species *Brugia malayi* (Bma), *Caenorhabditis elegans* (Cel), *Haemonchus contortus* (Hco) and *Parascaris univalens* (Pun). Predicted signal peptides in the N-terminal region are highlight in grey. Amino acids share between the four species are highlight in blue. The four transmembrane segments (TM1-4) and cys-loops are indicated by the black bars.

Signal peptide

```

Cel-GLC-4 : -----MKAQLYVSVLLALLVSS-TAKKSKTKSKCKRTAFSRHTTNYQAWREQMTVCDDLQDYDAVRPSGRTFYNDTR : 71
Pun-GLC-4 : -----MTSILRFSTALNVYFTLLVMLLLLDIVYSAKKARTKPKRTAFNRHTTNYRAWREQMTVCELLDNYDPAIRPSGKSPINDQK : 82
Ema-GLC-4 : MIIIFRTLTAAQRKIIHPTAA--VLFMLIMILTVAISL-ARQKKRKPCKRMAFNHRHTTNYRSWREQMTVCELLDNYDPTVRPSGRMPTNDQK : 88
Hco-GLC-4 : -----MRIHVILTIVLLVSLPFS-SSRVKKKSKCKRTTFRHTTNYQAWREQMTVCDDLQDYDAVRPSGRTFYNNR : 71

```



```

Cel-GLC-4 : GAVMVTTSINIRISAVSEKNMEFVAQFRFRQEWYDDRLRFIEHQGLSSDYRNFEFIHVARDQSLWIPDTFFQNEKNGWYHMLNQENRFL : 162
Pun-GLC-4 : GPVIVRTSLFIRISAVSERNMEFVAQFRFQQEWFDRLRFTEH-----SDFRNFDFIHVARDQLLWTPDTFFQNERNGWYHMLDQENKFI : 168
Ema-GLC-4 : GPVIVWTSLEIRISASISERNMEFVAQFRFQQEWFDRLRYTDH-----SDFRNFDFIHVARDQVLWIPDTFFQNERNGWYHMLDQENKFI : 174
Hco-GLC-4 : GPVIVVTSLNIRISAVSEKNMEFVAQFRFRQEWFDRLRFMDHQGPLSPDFRNFEFIHVARDQRLWIPDTFFQNERNGWHMLDQENRFL : 162

```


Cys-loop-1

```

Cel-GLC-4 : KIRSDGKLIYDRRLTLHLACSMHLSRYPMDHQNCETAFASYAYTTADIEYIWDVPAIQIHEGANGALPNFEIASFKNASCTSKTNTGTYSY : 253
Pun-GLC-4 : KVRSDGKVIYNRRLLTLILACNMNLIIRYPMDVQECLEDFASYAYTTNDIIYKWDQVGISVDEGANGALPNFVISAYKNSTCDSTNTGTYSY : 259
Ema-GLC-4 : KLRSDGKVIYNRRLLTLILACQMNLIRYPMDVQECLEDFASYAYTTDDIVYKWDRAAITIDKDANNALPNFRISAFENKSCDSTNTGTYSY : 265
Hco-GLC-4 : KIRSDGKLIYDRRLTLHLSCSMHLSRYPMDSQNCETAFASYAYTTDDIKYEWDEVAIRIHDGANGALPNFIATFRNGTCHSKTNTGTYSY : 253

```

Cys-loop-2

TM1

```

Cel-GLC-4 : LKVEIRLNRVFSFFLLQLYIPSSMLVGVAVWSYWDWKSTAARVPLAIVTLLTMITTSHAINSNLPPVSYAKSIDIWVGACVVFIFFSLIE : 344
Pun-GLC-4 : LRVELKLSRVFSFFLLQLYIPSSMLVGVSWVSYWDWKSTAARVPLAIVTLLTMITTSHAINSNLPPVSYTKAIDIWIGACVVFIFFSLIE : 350
Ema-GLC-4 : LRVELRLSRVFSFFLLQLYIPSTMLVGVSWVSYWDWKSTAARVPLAIVTLLTMITTSHAINSNLPPVSYTKAIDIWIGACVVFIFFSLIE : 356
Hco-GLC-4 : LRVELKLSRVFSFFLLQLYIPSSMLVGVAVISYWDWKSTAARVPLAIVTLLTMITTSHAINSNLPPVSYAKSIDIWVGACVVFIFFSLIE : 344

```

TM2

TM3


```

Cel-GLC-4 : YAVVNYVGILDEHRQMKKAACNRSRLSNVIENDNFGESLQSLT-----FSPQEKKRLLIRRRPKKNMEMQEG----DFEAIE-MVDRG-P : 422
Pun-GLC-4 : YAVVNYMGILDEHMQRKVTNSNTRLSSFLDNIEGYFNSVEQAQVASTSFTWSPEKKSLRRRRKYSFELREEE-----EHHE-LVDFCSP : 435
Ema-GLC-4 : YAVVNYVGILDKHREVRKMTCNQTRLTNVIEGLLYSPVECIAT-SPASCLNSPEKKSLRLYRRKQSFEE---E-----KSGE-LMD-CNP : 435
Hco-GLC-4 : YAVVNYMGILDEHRQMKKAACNRSRLSNVIDNQICMQSVEQMASPSSIVGFSPQEKKRLLRRRRKNSFELREEEVGLEIDGIE-LSDMSQP : 434

```


TM4

```

Cel-GLC-4 : PRSAGLMEEG-WTFHDTTDLVYIGQRKRVELVRWCSSLSSRGAERIDIIARIIFPILFNFAYWSIYLEEEDPDES----- : 500
Pun-GLC-4 : QRSTMRSPDPWTFFQDATDSVYIGQKRRVELVKWCSLLSSRSRAERIDIIARLIFPIAFVMFNAYWMIYLEEM--DTS----- : 512
Ema-GLC-4 : SH-ILHAPDPIWTFQDVSDLIYIGQRKRVELIRWCSSLSSRGAERIDIMARLIFPVARILFNFAYWSIYLEGEM--EE----- : 510
Hco-GLC-4 : PRTAGHVEEG-WTFQDTTDLVYIGQRKRIELVRWCSSLSSRGAERIDIIARIIFPILFNFAYWSIYLEEQ--DE----- : 509

```

Fig. S3: Amino-acid alignment of GLC-4 from the four nematode species *Brugia malayi* (Bma), *Caenorhabditis elegans* (Cel), *Haemonchus contortus* (Hco) and *Parascaris univalens* (Pun). Predicted signal peptides in the N-terminal region are highlight in grey. Amino acids share between the four species are highlight in blue. The four transmembrane segments (TM1-4) and cys-loops are indicated by the black bars.

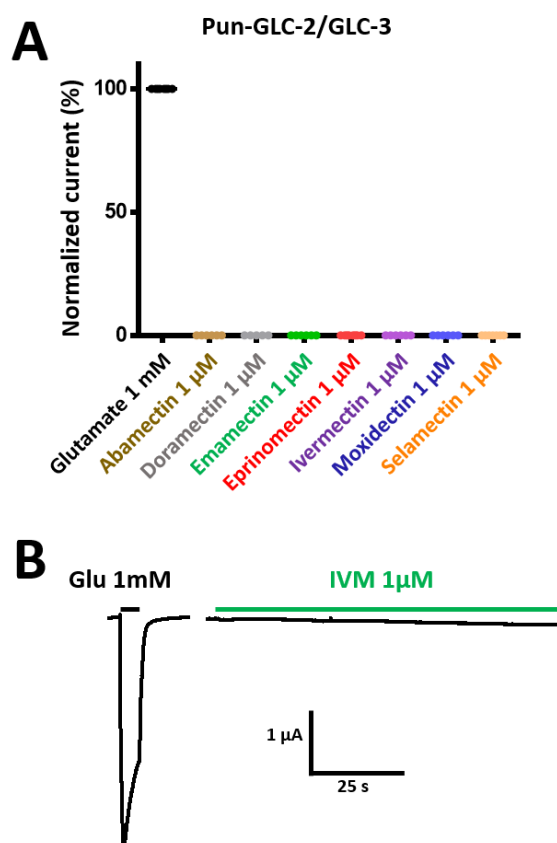


Fig. S4: Pharmacological characterization of GLC-2/GLC-3 from *P. univalens*

A. Comparison of the macrocyclic lactones effects at 1 μM after 5 s application on Pun-GLC-2/GLC-3. All responses are normalized to the maximum responses obtained with glutamate at 1 mM (Kruskal-Wallis with Bonferroni adjustments, $p < 0.05$).

B. Representative current traces induced by ivermectin at 1 μM for a longer time period (90 s), indicated by the bar, on Pun-GLC-2/GLC-3.

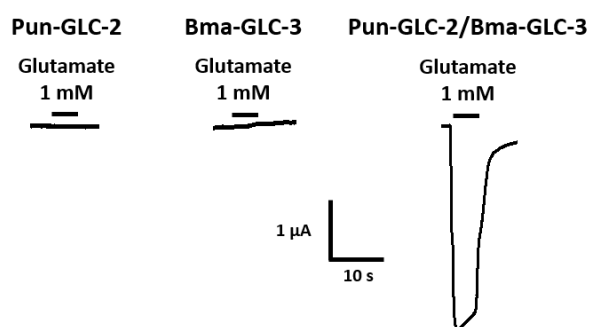


Fig. S5: Representative current traces after application of glutamate 1 mM on *Xenopus* oocytes expressing chimera receptors made of Pun-GLC-2 and Bma-GLC-3 (n = 12). Application time are indicated by the black bars.

Primer names	Sequences
Cel-avr-14b-FO	CTTGAGAGTTCTACAGTCAAATG
Cel-avr-14b-R0	AGTGTATTTGTCATGGAGTTTGG
Cel-avr-14b-XhoF	ctggcgccgctcgagGATGTGGCATTATCGACTGACG
Cel-avr-14b-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCTGTTGTAGTTAATCACGGCTCTG
Cel-glc-2-F0	CTTCTTGTCTCCATGGTTTCTAT
Cel-glc-2-R0	ATAGCAAATGTGGGAACAGTGG
Cel-glc-2-XhoF	ctggcgccgctcgagGCAATTATGACTACACCTAGTTC
Cel-glc-2-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCTAAACGAGAGACTCTGGAGTG
Cel-glc-3-F0	ATCATTCTCTCGGATTTTCGCG
Cel-glc-3-R0	TTCAATCACGGGTGTCAGAGG
Cel-glc-3-XhoF	ctggcgccgctcgagGATGAGTCTCCGTTCACTTCTC
Cel-glc-3-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCTCATTTGGCTTCCGGTGCGTG
Cel-glc-4-F0	CGAAGGAAACCGTCTATCACC
Cel-glc-4-R0	ctggcgccgctcgagCGTAATGAAAGCTCAGCTATACG
Cel-glc-4-XhoF	ATATTGCCACGGCGAGAAAGC
Cel-glc-4-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCTCATGACTCGTCCGGATCCTC

Table S1: List of primers used for PCR and cloning experiments of GluCl subunits from *C. elegans*.

Primer names	Sequences
Bma-avr-14b-F0	GGAAAAAATTTACAAATTATGAATGG
Bma-avr-14b-R0	TGCACCTGTTTGAATTGATTTCC
Bma-avr-14b-XhoF	ctggcggccgctcgagATGAATGGTTGTATGATTTGTTGG
Bma-avr-14b-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCCCATCTTCTGATATACCTGCACC
Bma-glc-2-F0	TACAAAATTTCACTTTTCCAGC
Bma-glc-2-R0	AAACAAAAATATGTTGAAAAAATCAG
Bma-glc-2-XhoF	ctggcggccgctcgagTCCAGCTTAACTATGCTATCTTC
Bma-glc-2-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCTCAGTTTTTAGGACCGTATTCAGACG
Bma-glc-3-F0	GTTGGTGTCATCTATTATCAACG
Bma-glc-3-R0	CAATTAAAAAGGTCAAAAATTCTCG
Bma-glc-3-XhoF	CTGGCGGCCGCTCGAGCAACGAGTATTCCGCTGAATGC
Bma-glc-3-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCCAATAAATAAATTATGTTGG
Bma-glc-4-F0	TATGATGAAAAGCGCATCGAGC
Bma-glc-4-R0	GTTTATATAAATGCATCTAACTTTG
Bma-glc-4-XhoF	ctggcggccgctcgagTGAAAAGCGCATCGAGCATAACG
Bma-glc-4-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCCATCTAACTTTGAAATGATGACTTG

Table S2: List of primers used for PCR and cloning experiments of GluCl subunits from *Brugia malayi*.

Primer names	Sequences
Pun-avr-14b-F2	ACCACTCAAGCTTCGGGCATC
Pun-avr-14b-F3	CGGTCGATGTGTGGATAGGTG
Pun-avr-14b-R1	ACGTGTGAAAAAATGTATAATAAGG
Pun-avr-14b-R2	CTGTGTTAAAGGCTGATCGCTA
Pun-avr-14b-FO	GACGCGGGGAGTCGGATTGT
Pun-avr-14b-R0	CGCAACAATAGGATCGTGGCG
Pun-avr-14b-XhoF	ctggcggccgctcgagTATCGGAGAATGCGCTGTGCG
Pun-avr-14b-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCCACATAGTTTCGTCTTGTGATCTC
Pun-glc-2-F1	AAGCCAGGTGTTGGCAACGAC
Pun-glc-2-F2	GCCTTTGTTTCCTATCAAGATAGT
Pun-glc-2-R1	GTTGCGTAAGTCGTTGCCAAC
Pun-glc-2-R2	AACGACATCGATTTTACTCAGCAT
Pun-glc-2-R3	AGAGCACTTGTCATCGGGATA
Pun-glc-2-R4	GTAGCATTATGTTGACACTAACAAT
Pun-glc-2-F0	ACATATTTACACCCGGCTGTCC
Pun-glc-2-R0	CGTAAGTGAATCGCCATCGAAG
Pun-glc-2-XhoF	ctggcggccgctcgagCCATTTATTGAGCAGTGGCGGA
Pun-glc-2-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCCAACTTTGAAGAATACGAATGCATG
Pun-glc-3-F1	TGAATATGTATGGAAGAGTACAGAT
Pun-glc-3-F2	GCCTGAGGACCGTGCTCGAA
Pun-glc-3-F3	CATGGGTCACTTATATTTCTCC
Pun-glc-3-F4	CATCTGGTATTAACGCCAAATTAC
Pun-glc-3-R1	TGAGCTGTACCGGATCTGTACT
Pun-glc-3-R2	TCGGGTTTATTATCGCGAGGTAA
Pun-glc-3-R3	CATGACTTCCAGGGAGACTTAG
Pun-glc-3-R4	GTAGCCCTTACCAAGCAATTTGT
Pun-glc-3-R5	GCCCTTACCAAGCAATTTGTTG
Pun-glc-3-F0	TTGACGTGTCGACTGTGGTACG
Pun-glc-3-R0	TATATGTTGTCGTGTTGAGG
Pun-glc-3-XhoF	ctggcggccgctcgagATGACCGATATCCTTCATGACG
Pun-glc-3-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCCCTACGTAGGCATTGACACTCG
Pun-glc-4-F1	TCTCGACGAGCACATGCAAATG
Pun-glc-4-F2	TTTGAGTTACGTGAGGAAGAG
Pun-glc-4-R1	GAGCATATGATACCATCCATTGC
Pun-glc-4-R2	TCTCTGGCAACGTGAATGAAATC
Pun-glc-4-F0	GAGAGGAATTGTGATCACAACG
Pun-glc-4-R0	TTGGAGGATCCATCAAGAAGTG
Pun-glc-4-XhoF	ctggcggccgctcgagTCTCAAAATGACATCAATATTACG
Pun-glc-4-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCTCAAGAAGTGTCATCTCTTCC

Table S3: List of primers used for PCR and cloning experiments of GluCl subunits from *Parascaris univalens*.

Supporting information

Title: Functional investigation of highly conserved glutamate receptor subunits in nematodes revealed new subsets of heteromeric channels with original pharmacological properties

Authors : Nicolas Lamassiaude¹, Elise Courtot¹, Angélique Corset¹, Claude L. Charvet^{1*} and Cédric Neveu¹

¹INRAE, Université de Tours, ISP, F-37380, Nouzilly, France

Journal : PLoS Pathogens

References

1. Blaxter M, Koutsovolos G. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*. 2015 Feb;142(S1):S26–39.
2. 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 Mar 5;392(6671):71–5.
3. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors*. 2014;7(1):37.
4. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2016. *Releve Epidemiol Hebd*. 2017 06;92(40):594–607.
5. Hiérarchisation de 103 maladies animales présentes dans les filières ruminants, équidés, porcs, volailles et lapins en France métropolitaine [Internet]. ANSES; 2012 Jul p. 327. Report No.: ISBN 978-2-11-129548-3. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2010sa0280Ra.pdf>
6. Reinemeyer CR, Nielsen MK. Parasitism and colic. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2009 Aug;25(2):233–45.
7. Matthews JB, Geldhof P, Tzelos T, Claerebout E. Progress in the development of subunit vaccines for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasite Immunol*. 2016 Dec;38(12):744–53.
8. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol*. 2017 Jun;33(6):463–72.
9. Campbell WC. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 May;13(6):853–65.
10. Ramaiah KD, Ottesen EA. Progress and impact of 13 years of the global programme to eliminate lymphatic filariasis on reducing the burden of filarial disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov;8(11):e3319.
11. Kaplan RM, Vidyashankar AN. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet Parasitol*. 2012 May 4;186(1–2):70–8.
12. Osei-Atweneboana MY, Awadzi K, Attah SK, Boakye DA, Gyapong JO, Prichard RK. Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Mar 29;5(3):e998.
13. Kelleher AC, Good B, de Waal T, Keane OM. Anthelmintic resistance among gastrointestinal nematodes of cattle on dairy calf to beef farms in Ireland. *Ir Vet J*. 2020 Dec;73(1):12.
14. Geurden T, Chartier C, Fanke J, di Regalbono AF, Traversa D, von Samson-Himmelstjerna G, et al. Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2015 Dec;5(3):163–71.
15. Bourguinat C, Lee ACY, Lizundia R, Blagburn BL, Liotta JL, Kraus MS, et al. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Vet Parasitol*. 2015 Jun;210(3–4):167–78.
16. Wolstenholme AJ, Evans CC, Jimenez PD, Moorhead AR. The emergence of macrocyclic lactone resistance in the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*. 2015 Sep;142(10):1249–59.
17. Williamson SM, Storey B, Howell S, Harper KM, Kaplan RM, Wolstenholme AJ. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. 2011 Dec;180(2):99–105.
18. Beasley A, Coleman G, Kotze A. Suspected ivermectin resistance in a south-east Queensland *Parascaris equorum* population. *Aust Vet J*. 2015 Sep;93(9):305–7.
19. Boersema JH, Eysker M, Nas JWM. Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet Rec*. 2002 Mar 2;150(9):279–81.

20. Laugier C, Sevin C, Ménard S, Maillard K. Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France. *Vet Parasitol.* 2012 Aug;188(1–2):185–9.
21. Lind EO, Christensson D. Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs. *Acta Vet Scand.* 2009 Nov 22;51:45.
22. Molento MB, Antunes J, Bentes RN, Coles GC. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet Rec.* 2008 Mar 22;162(12):384–5.
23. Stoneham S, Coles G. Ivermectin resistance in *Parascaris equorum*. *Vet Rec.* 2006 Apr 22;158(16):572.
24. Veronesi F, Fioretti DP, Genchi C. Are macrocyclic lactones useful drugs for the treatment of *Parascaris equorum* infections in foals? *Vet Parasitol.* 2010 Aug;172(1–2):164–7.
25. von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, Schürmann S, Rohn K, Schnieder T, et al. Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol.* 2007 Mar 15;144(1–2):74–80.
26. Dent JA, Smith MM, Vassilatis DK, Avery L. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2674–9.
27. Njue AI, Hayashi J, Kinne L, Feng X-P, Prichard RK. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *J Neurochem.* 2004 Jun;89(5):1137–47.
28. McCavera S, Rogers AT, Yates DM, Woods DJ, Wolstenholme AJ. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Mol Pharmacol.* 2009 Jun 1;75(6):1347–55.
29. Ghosh R, Andersen EC, Shapiro JA, Gerke JP, Kruglyak L. Natural Variation in a Chloride Channel Subunit Confers Avermectin Resistance in *C. elegans*. *Science.* 2012 Feb 3;335(6068):574–8.
30. Njue AI, Prichard RK. Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*. *Parasitology.* 2004 Dec;129(Pt 6):741–51.
31. Kotze AC, Hunt PW, Skuce P, von Samson-Himmelstjerna G, Martin RJ, Sager H, et al. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014 Dec;4(3):164–84.
32. El-Abdellati A, De Graef J, Van Zeveren A, Donnan A, Skuce P, Walsh T, et al. Altered *avr-14B* gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *Int J Parasitol.* 2011 Aug;41(9):951–7.
33. Bygarski EE, Prichard RK, Ardelli BF. Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014 Dec;4(3):143–51.
34. Demeler J, Krücken J, AlGusbi S, Ramünke S, De Graef J, Kerboeuf D, et al. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Mol Biochem Parasitol.* 2013 Mar;188(1):10–9.
35. Geary TG, Sakanari JA, Caffrey CR. Anthelmintic drug discovery: into the future. *J Parasitol.* 2015 Apr;101(2):125–33.
36. Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Paress PS, Van der Ploeg LH, Schaeffer JM, et al. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1994 Oct 20;371(6499):707–11.
37. Cook A, Aptel N, Portillo V, Siney E, Sihota R, Holden-Dye L, et al. *Caenorhabditis elegans* ivermectin receptors regulate locomotor behaviour and are functional orthologues of *Haemonchus contortus* receptors. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 May;147(1):118–25.

38. Dent JA, Davis MW, Avery L. *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*. 1997 Oct 1;16(19):5867–79.
39. Holden-Dye L, Walker RJ. Actions of glutamate and ivermectin on the pharyngeal muscle of *Ascaridia galli*: A comparative study with *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol*. 2006 Apr;36(4):395–402.
40. Degani-Katzav N, Gortler R, Gorodetzki L, Paas Y. Subunit stoichiometry and arrangement in a heteromeric glutamate-gated chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 2;113(5):E644–653.
41. Hibbs RE, Gouaux E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*. 2011 Jun 2;474(7349):54–60.
42. Bianchi L. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook* [Internet]. 2006 [cited 2018 Jul 20]; Available from: http://www.wormbook.org/chapters/www_channelexpress/channelexpress.html
43. Vassilatis DK, Arena JP, Plasterk RH, Wilkinson HA, Schaeffer JM, Cully DF, et al. Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):33167–74.
44. Heusser SA, Yoluk Ö, Klement G, Riederer EA, Lindahl E, Howard RJ. Functional characterization of neurotransmitter activation and modulation in a nematode model ligand-gated ion channel. *J Neurochem*. 2016 Jul;138(2):243–53.
45. Horoszok L, Raymond V, Sattelle DB, Wolstenholme AJ. GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *Br J Pharmacol*. 2001 Mar;132(6):1247–54.
46. *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2012–8.
47. Atif M, Estrada-Mondragon A, Nguyen B, Lynch JW, Keramidas A. Effects of glutamate and ivermectin on single glutamate-gated chloride channels of the parasitic nematode *H. contortus*. Wolstenholme AJ, editor. *PLOS Pathog*. 2017 Oct 2;13(10):e1006663.
48. Cheeseman CL, Delany NS, Woods DJ, Wolstenholme AJ. High-affinity ivermectin binding to recombinant subunits of the *Haemonchus contortus* glutamate-gated chloride channel. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 May;114(2):161–8.
49. Yates DM, Wolstenholme AJ. An ivermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel subunit from *Dirofilaria immitis*. *Int J Parasitol*. 2004 Aug;34(9):1075–81.
50. Atif M, Smith JJ, Estrada-Mondragon A, Xiao X, Salim AA, Capon RJ, et al. GluClR-mediated inhibitory postsynaptic currents reveal targets for ivermectin and potential mechanisms of ivermectin resistance. *PLoS Pathog*. 2019 Jan 29;15(1):e1007570.
51. Beech RN, Wolstenholme AJ, Neveu C, Dent JA. Nematode parasite genes: what's in a name? *Trends Parasitol*. 2010 Jul;26(7):334–40.
52. Williamson SM, Walsh TK, Wolstenholme AJ. The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Brugia malayi* and *Trichinella spiralis*: a comparison with *Caenorhabditis elegans*. *Invert Neurosci*. 2007 Nov 23;7(4):219–26.
53. Clements J, Lester R, Tong G, Jahr C, Westbrook G. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science*. 1992 Nov 27;258(5087):1498–501.
54. Clements J. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci*. 1996 May;19(5):163–71.
55. Pemberton DJ, Franks CJ, Walker RJ, Holden-Dye L. Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl- α 2 in the function of the native receptor. *Mol Pharmacol*. 2001 May;59(5):1037–43.

56. Cao J, Packer JS, Ramani V, Cusanovich DA, Huynh C, Daza R, et al. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science*. 2017 18;357(6352):661–7.
57. Hutter H, Suh J. GExplore 1.4: An expanded web interface for queries on *Caenorhabditis elegans* protein and gene function. *Worm*. 2016;5(4):e1234659.
58. Boulin T, Gielen M, Richmond JE, Williams DC, Paoletti P, Bessereau J-L. Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 25;105(47):18590–5.
59. Courtot E, Charvet CL, Beech RN, Harmache A, Wolstenholme AJ, Holden-Dye L, et al. Functional Characterization of a Novel Class of Morantel-Sensitive Acetylcholine Receptors in Nematodes. Aroian RV, editor. *PLOS Pathog*. 2015 Dec 1;11(12):e1005267.
60. de Moraes J, Geary TG. FDA-Approved Antiparasitic Drugs in the 21st Century: A Success for Helminthiasis? *Trends Parasitol*. 2020 Jul;36(7):573–5.
61. Gokbulut C, McKellar QA. Anthelmintic drugs used in equine species. *Vet Parasitol*. 2018 Sep 15;261:27–52.
62. Lees F, Baillie M, Gettinby G, Revie CW. The Efficacy of Emamectin Benzoate against Infestations of *Lepeophtheirus salmonis* on Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L) in Scotland, 2002–2006. Thompson R, editor. *PLoS ONE*. 2008 Feb 6;3(2):e1549.
63. Ardelli BF, Stitt LE, Tompkins JB, Prichard RK. A comparison of the effects of ivermectin and moxidectin on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet Parasitol*. 2009 Oct;165(1–2):96–108.
64. El-Saber Batiha G, Alqahtani A, Ilesanmi OB, Saati AA, El-Mleeh A, Hetta HF, et al. Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects. *Pharmaceuticals*. 2020 Aug 17;13(8):196.
65. Boyle JP, Yoshino TP. Gene manipulation in parasitic helminths. *Int J Parasitol*. 2003 Sep;33(11):1259–68.
66. Selkirk ME, Huang SC, Knox DP, Britton C. The development of RNA interference (RNAi) in gastrointestinal nematodes. *Parasitology*. 2012 Apr;139(5):605–12.
67. Blanchard A, Guégnard F, Charvet CL, Crisford A, Courtot E, Sauvé C, et al. Deciphering the molecular determinants of cholinergic anthelmintic sensitivity in nematodes: When novel functional validation approaches highlight major differences between the model *Caenorhabditis elegans* and parasitic species. *PLoS Pathog*. 2018;14(5):e1006996.
68. Verma S, Kashyap SS, Robertson AP, Martin RJ. Functional genomics in *Brugia malayi* reveal diverse muscle nAChRs and differences between cholinergic anthelmintics. *Proc Natl Acad Sci*. 2017 May 23;114(21):5539–44.
69. Kashyap SS, Verma S, Voronin D, Lustigman S, Kulke D, Robertson AP, et al. Emodepside has sex-dependent immobilizing effects on adult *Brugia malayi* due to a differentially spliced binding pocket in the RCK1 region of the SLO-1 K channel. Geary TG, editor. *PLOS Pathog*. 2019 Sep 25;15(9):e1008041.
70. Storey B, Marcellino C, Miller M, Maclean M, Mostafa E, Howell S, et al. Utilization of computer processed high definition video imaging for measuring motility of microscopic nematode stages on a quantitative scale: “The Worminator.” *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014 Dec;4(3):233–43.
71. Liu C, De SL, Miley K, Unnasch TR. In vivo imaging of transgenic *Brugia malayi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Apr;14(4):e0008182.
72. Nielsen MK, Wang J, Davis R, Bellaw JL, Lyons ET, Lear TL, et al. *Parascaris univalens*--a victim of large-scale misidentification? *Parasitol Res*. 2014 Dec;113(12):4485–90.
73. Martin F, Höglund J, Bergström TF, Karlsson Lindsjö O, Tydén E. Resistance to pyrantel embonate and efficacy of fenbendazole in *Parascaris univalens* on Swedish stud farms. *Vet Parasitol*. 2018 Dec 15;264:69–73.

74. Boulin T, Fauvin A, Charvet CL, Cortet J, Cabaret J, Bessereau J-L, et al. Functional reconstitution of *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. *Br J Pharmacol*. 2011 Nov;164(5):1421–32.
75. Charvet CL, Guégnard F, Courtot E, Cortet J, Neveu C. Nicotine-sensitive acetylcholine receptors are relevant pharmacological targets for the control of multidrug resistant parasitic nematodes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018 Dec;8(3):540–9.
76. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011 Oct;8(10):785–6.
77. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 May 26;95(11):5857–64.
78. Madeira F, Park Y mi, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W636–41.
79. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*. 2010 Feb;27(2):221–4.
80. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. Xia Y, editor. *PLOS ONE*. 2015 Dec 30;10(12):e0146021.

II. Mode d'action des lactones macrocycliques sur une sous-unité de canal chlorure glutamate dépendant chez les nématodes parasites *Parascaris univalens* et *Haemonchus contortus*

Le travail qui suit donnera lieu à une publication qui est en cours d'écriture pour une soumission dans le journal PLoS Pathogens. Cette future publication a pour titre « Molecular and functional characterisation of a glutamate-gated chloride channel found in parasitic nematodes *Parascaris univalens* and *Haemonchus contortus* ».

CONTEXTE

Parascaris univalens est un nématode parasite gastro-intestinal infestant les équidés partout dans le monde. Il est l'agent responsable de l'ascaridiose équine provoquant des troubles respiratoires et digestifs, un ralentissement de croissance des poulains et des coliques d'impactions pouvant conduire à la mort de l'animal dans les cas les plus graves (48). Les poulains ayant un système immunitaire immature, la charge parasitaire provoquée par *P. univalens* est contrôlée par l'utilisation de trois familles d'anthelminthiques : les lactones macrocycliques (MLs), les benzimidazoles et les tétrahydropyrimidines (pyrantel). L'utilisation déraisonnée de ces anthelminthiques a contribué au développement et à la propagation de résistances pour plusieurs nématodes d'intérêt vétérinaire incluant *P. univalens* (59,160,168,297–299). Malgré un contrôle de la parasitémie de plus en plus difficile, le mode d'action de ces drogues ainsi que leurs cibles pharmacologiques restent méconnus dans un grand nombre d'espèces parasitaires d'importance vétérinaire. Les lactones macrocycliques sont les molécules les plus utilisées pour lutter contre le parasitisme équin. Elles ciblent principalement les canaux chlorures glutamate-dépendant (GluCl) qui sont exclusivement présents dans le système nerveux des invertébrés ce qui en font de formidables cibles pharmacologiques. Les MLs activent ces récepteurs ce qui conduit à une paralysie flasque du parasite et à son élimination via les fèces de l'animal. Chez les nématodes, 8 gènes codant des sous-unités de GluCl ont été décrits : *avr-14*, *avr-15*, *glc-1*, *glc-2*, *glc-3*, *glc-4*, *glc-5* et *glc-6*. Les gènes *glc-5* et *glc-6* n'ont été identifiés que chez le nématode parasite des petits ruminants *Haemonchus contortus*. Une telle spécificité d'espèce en font des cibles pharmacologiques très intéressantes dans un contexte de traitements ciblés. Des recherches dans les bases de données génomiques et transcriptomiques de *P. univalens* ont permis d'identifier une séquence homologue de *glc-5* mais pas de *glc-6*. L'identification de nouvelles cibles pharmacologiques est nécessaire pour faciliter le développement de nouveaux traitements et pour comprendre leur mode d'action.

OBJECTIFS

Les objectifs de cette étude étaient d'identifier la sous-unité GLC-5 de *P. univalens* et de réaliser sa caractérisation fonctionnelle et pharmacologique pour mieux comprendre le mode d'action des lactones macrocycliques sur ce parasite.

METHODES

En s'appuyant sur la sous-unité *glc-5* d'*H. contortus*, la recherche de similarités de séquences dans les bases de données de *P. univalens* a permis d'identifier des portions de séquences de *Pun-glc-5*. Des RACE-PCR ont été réalisées pour identifier la séquence codante complète de la sous-unité qui a ensuite été clonée dans un vecteur de transcription.

Les ARNc correspondant à la sous-unité *Pun-glc-5* ont été synthétisés *in vitro* puis injectés dans le système d'expression hétérologue œuf de xénope. La caractérisation fonctionnelle et pharmacologique a été réalisée par la technique de voltage-clamp en double électrodes. Aussi, la rapidité d'action d'un large panel de lactones macrocycliques (abamectine, doramectine, émamectine, éprinomectine, ivermectine, moxidectine et selamectine) a été évaluée.

Pour étudier la localisation de *Pun-glc-5*, le promoteur de cette sous-unité a été cloné dans un vecteur de façon à ce qu'il contrôle l'expression de la GFP. Cette construction a été injectée dans les gonades du nématode modèle et système d'expression hétérologue *Caenorhaditis elegans*. La localisation de l'expression de la GFP est observée sur la génération F1 à l'aide d'un microscope à fluorescence inversé.

De même, pour confirmer que Pun-GLC-5 est bien une cible des lactones macrocycliques *in vivo*, une construction contenant le promoteur suivi de la séquence codante de *glc-5* ont été injectée dans les gonades d'une souche de *C. elegans* résistante à l'ivermectine (JD369 : knockdown d'*avr-14*, *avr-15*, *glc-1* et *glc-3*). Des tests de mobilité ont été réalisés pour évaluer la capacité de mouvement des mutants en présence ou non d'ivermectine.

Enfin, en se basant sur le récepteur Cel-GLC-1 qui a été cristallisé, des études de modélisation par homologie ont permis d'identifier les acides aminés importants dans la liaison au glutamate, à l'ibotenante et à l'ivermectine pour les récepteurs GLC-5 de *P. univalens* et de *H. contortus*. Les études de modélisation ont été réalisées par le groupe de Sean Forrester (Ontario Tech University, Canada).

RESULTATS

Identification de *glc-5* chez *Parascaris univalens*

La recherche de séquences homologues dans les bases de données génomiques de *Parascaris sp.* (NCBI) par rapport à la sous-unité *glc-5* déjà décrite chez *H. contortus* a permis l'identification de séquences partielles codant pour un GluCl. L'identification des extrémités 5' et 3' de cette sous-unité par séquençage des produits des 5' et 3'RACE-RT-PCR a permis de définir de nouvelles amorces pour amplifier et cloner sa séquence codante complète. L'ADNc complet de 1637 pb a été nommé *Pun-glc-5* et déposé dans Genbank sous le numéro d'accèsion MH816997.1. La séquence codante complète de 1269 pb code une protéine de 422 acides aminés pour laquelle aucune sous-unité homologue n'a pu être identifiée chez *C. elegans*. Cependant, cette sous-unité est très similaire à Hco-GLC-5 avec qui elle partage 72,4 % d'identité et 81,3 % de similarité au niveau protéique. Ces deux sous-unités GLC-5 partagent les éléments caractéristiques des LGIC à cys loop. En effet, elles possèdent un peptide signal en C-ter, un domaine extracellulaire dans sa partie N-terminal contenant 2 domaines cys-loop formés par des ponts disulfures caractéristiques des sous-unités de GluCl avec 7 boucles (loops A-F) impliquées dans la liaison au ligand, 4 domaines transmembranaires (TM1-4) et un domaine intracellulaire hypervariable entre les domaines transmembranaires TM3 et TM4 (**Figure 29**).

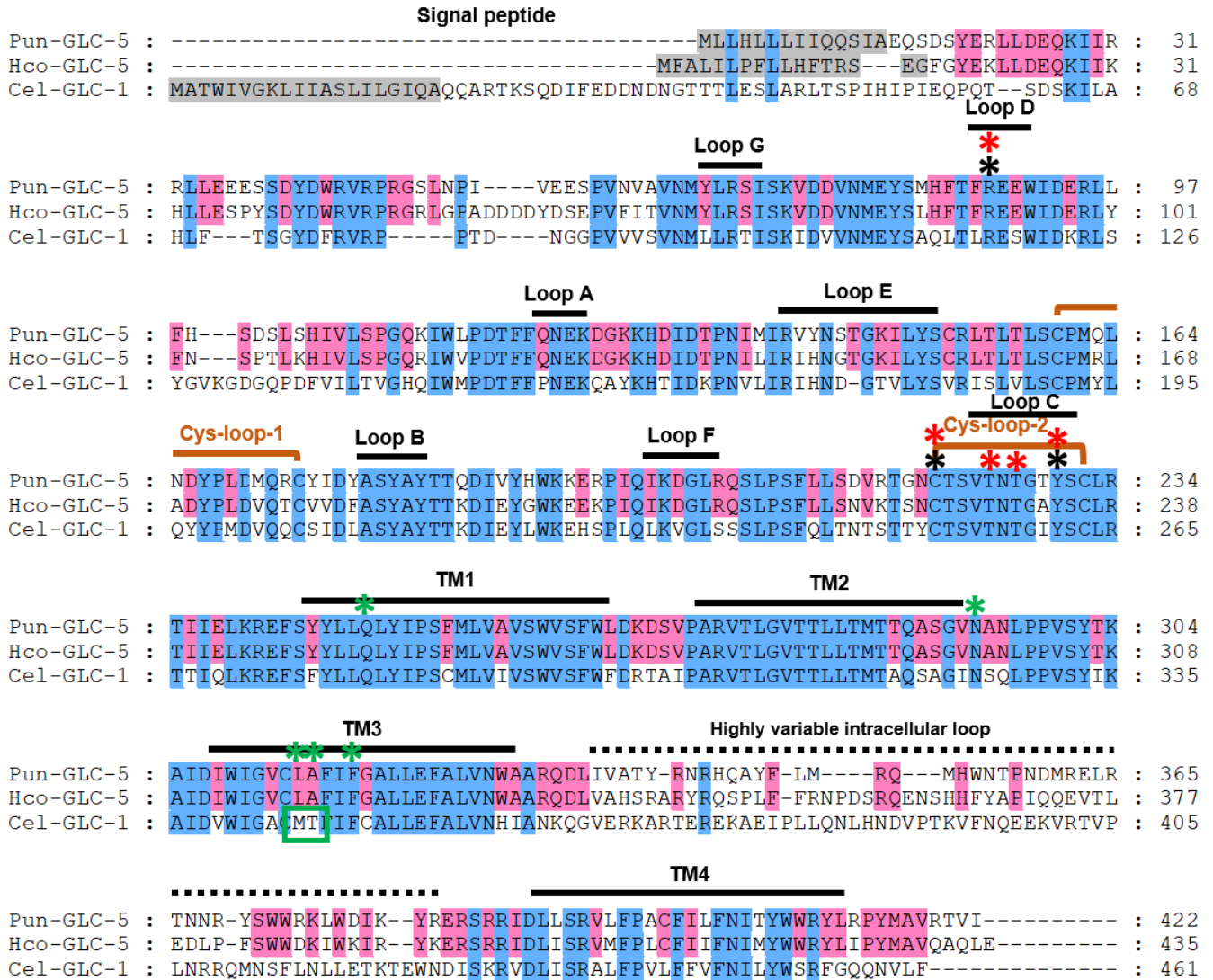


Figure 29: Alignement des séquences protéiques des sous-unités GLC-5 de *Parascaris univalens* (Pun) et *Haemonchus contortus* (Hco) avec la sous-unité GLC-1 de *Caenorhabditis elegans* (Cel)

Les peptides signaux sont prédits avec SignalP5.0 et sont colorés en gris. Les acides aminés identiques partagés par les trois séquences sont colorés en bleu tandis que les acides aminés identiques partagés par les sous-unités GLC-5 sont colorés en rose. Les 7 boucles (Loop A-G), les cystéines formant les cys-loop, et les 4 domaines transmembranaires (TM1-4) sont indiqués avec des barres noires ou marrons au-dessus des séquences. Les étoiles au-dessus des séquences représentent les acides aminés clés dans la liaison au glutamate (étoiles rouges), à l'iboténate (étoiles noires) et à l'ivermectine (étoiles vertes).

Un arbre de distance des sous-unités de GluCls de *C. elegans*, *H. contortus* et *P. univalens* a été construit pour confirmer la nomenclature utilisée pour la nouvelle séquence identifiée et pour comprendre sa relation en termes d'évolution par rapport aux autres sous-unités de GluCls de nématodes. Ainsi, l'arbre confirme la relation d'orthologie entre Hco-GLC-5 et Pun-GLC-5 (**Figure 30**). Les sous-unités GLC-5 des deux espèces sont étroitement liées aux autres sous-unités GluCls AVR-14, AVR-15, GLC-1 et GLC-3 qui sont toutes décrites comme étant impliquées dans la sensibilité aux MLs (17,300) à l'inverse de GLC-2 et GLC-4 qui ne le sont pas. A ce jour, GLC-5 n'était décrite que chez le nématode parasite *H. contortus* (231). Des recherches dans les bases de données de WormBase Parasite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>, 105 espèces de *Nematoda*) ont permis d'identifier des séquences complètes ou partielles d'homologues de Pun-GLC-5 chez un nombre restreint d'espèces de nématodes libres ou parasites (>14 espèces) issues de différents clades telles que *Ascaris suum* (clade III, parasite), *Panagrellus redivivus* (clade IV, libre), *Haliceaphalobus mephisto* (clade IV, libre) ou *Heligmosomoides polygyrus* (clade V, parasite) (**Figure 31**).

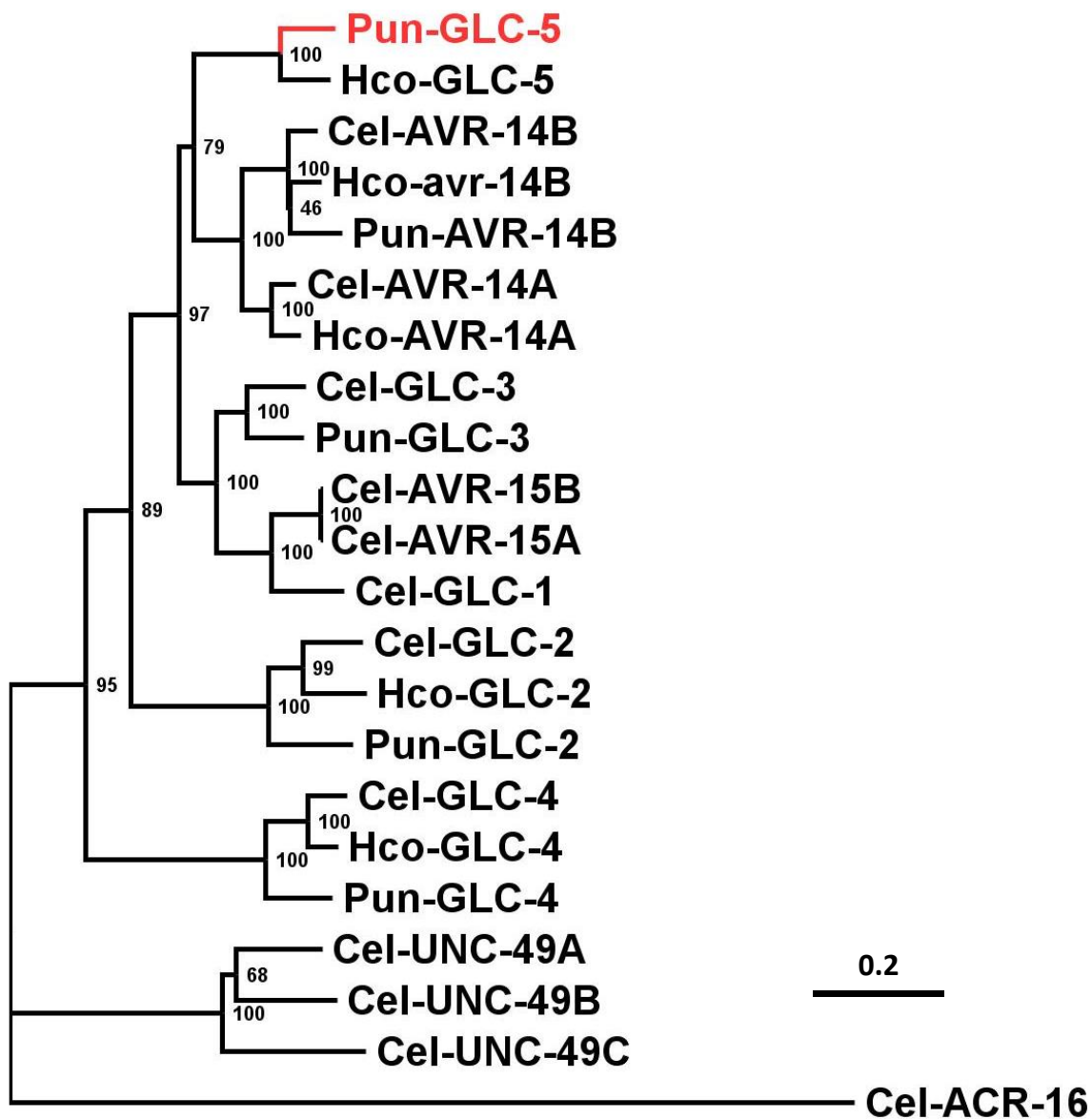


Figure 30: Arbre de distance (BioNJ, Poisson) des séquences protéiques de GluCl (AVR-14, AVR-15, GLC-1, GLC-2, GLC-3, GLC-4 et GLC-5) des nématodes *C. elegans* (Cel), *H. contortus* (Hco) et *P. univalens* (Pun).

L'arbre a été construit par rapport à un alignement des sous-unités de GluCl sans leur peptide signal. L'arbre est enraciné avec la sous-unité ACR-16 de *C. elegans* codant pour un récepteur cholinergique sensible à la nicotine. La longueur des branches est proportionnelle au nombre de substitution par acide aminé. L'échelle représente le nombre de substitution par site. Les valeurs de bootstrap sont indiquées à droite de chaque nœud. La sous-unité Pun-GLC-5 décrite dans cette étude est colorée en rouge.

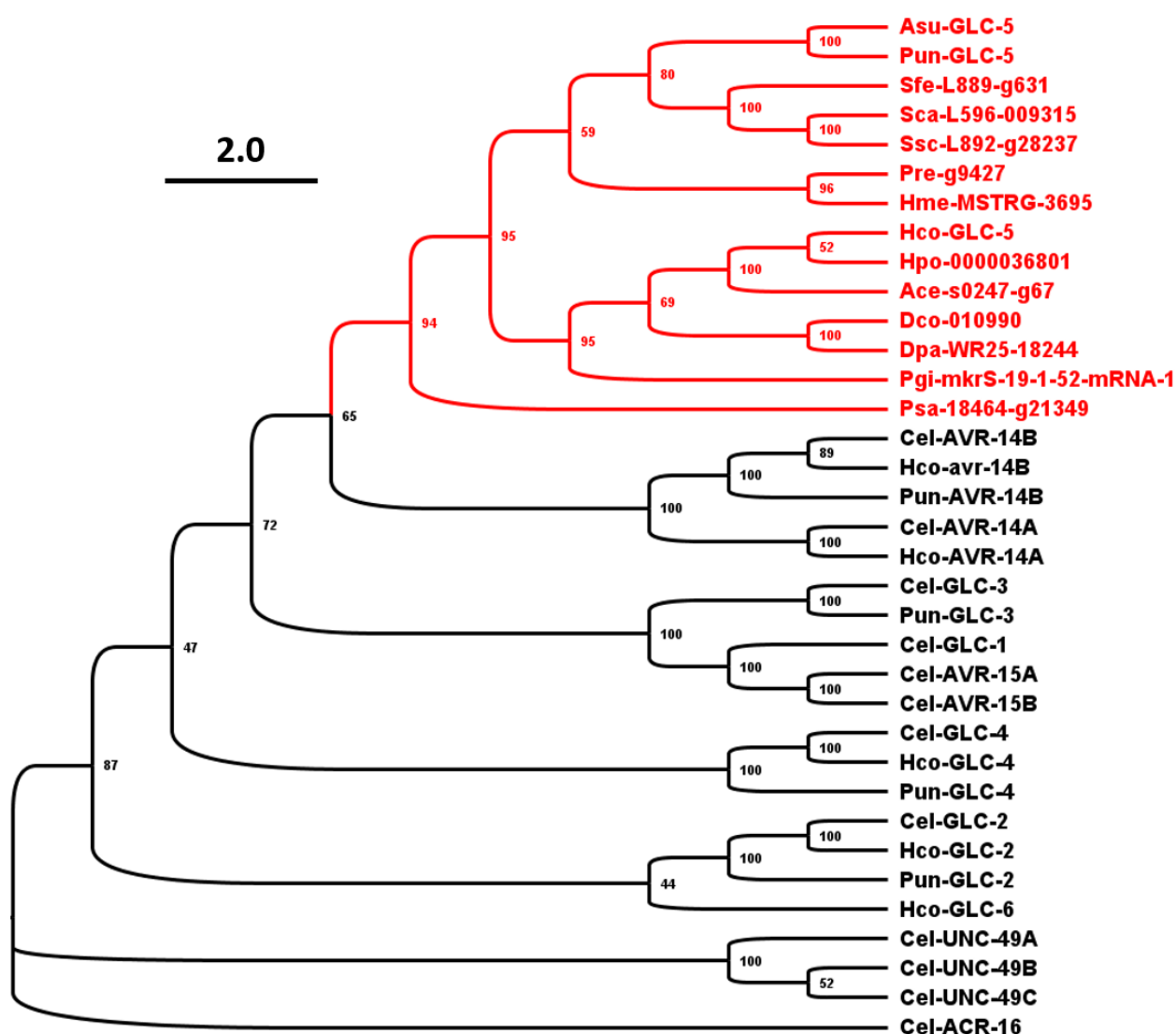


Figure 31: Arbre de distance (BioNJ, Poisson) montrant la relation des sous-unités GLC-5 de nématodes (*Ancylostoma ceylanicum* (Ace), *Ascaris suum* (Asu), *Diploscapter coronatus* (Dco), *Diploscapter pachys* (Dpa), *Halicephalobus mephisto* (Hme), *Heligmosomoides polygyrus* (Hpo), *Panagrellus redivivus* (Pre), *Parapristionchus gibilindavisi* (Pgi), *Plectus sambesii* (Psa), *Steinermia carpocapsae* (Sca), *Steinermia feltia* (Sfe), *Steinermia scapterisci* (Ssc)) avec les sous-unités de GluCl (AVR-14, AVR-15, GLC-1, GLC-2, GLC-3, GLC-4, GLC-5 et GLC-6) des nématodes *C. elegans* (Cel), *H. contortus* (Hco) et *P. univalens* (Pun). Sont également inclus les sous-unités UNC-49 de *C. elegans* codant pour des récepteurs au GABA.

L'arbre a été construit par rapport à un alignement des GluCl sans leur peptide signal. L'arbre est enraciné avec la sous-unité ACR-16 de *C. elegans* codant pour un récepteur cholinergique sensible à la nicotine. La longueur des branches est proportionnelle au nombre de substitution par acide aminés. L'échelle représente le nombre de substitution par site. Les valeurs de bootstrap sont indiquées à droite de chaque nœud. Le groupe des sous-unités GLC-5 est coloré en rouge.

Pun-GLC-5 forme un récepteur homomérique fonctionnel sensible au glutamate et perméable au chlore

Une étude précédente a montré que GLC-5 d'*H. contortus* formait un récepteur au glutamate fonctionnel en ovocytes de xénope (231) d'où l'hypothèse que la sous-unité orthologue retrouvée chez *P. univalens* pouvait aussi former un récepteur homomérique fonctionnel. Les ARNc de *Pun-glc-5* ont été injectés dans les œufs de xénope et leur capacité à former des récepteurs fonctionnels a été évaluée par la méthode de voltage-clamp en double électrodes. L'application de glutamate sur les œufs exprimant Pun-GLC-5 a permis l'enregistrement de courants entrant rapides de l'ordre du μA avec une rapide désensibilisation (**Figure 32A**). Dans le but d'étudier la pharmacologie de ce récepteur, différents analogues structuraux du glutamate (iboténate, GABA, glycine et aspartate) ainsi que l'anthelminthique pipérazine (agoniste GABAergique) ont été appliqués sur les œufs exprimant Pun-GLC-5. Seul l'iboténate a montré un effet agoniste sur Pun-GLC-5 avec une réponse correspondant à $87 \pm 6\%$ de la réponse maximum obtenue avec une concentration saturante de glutamate (1 mM). A l'inverse, le GABA, la glycine, l'aspartate et la pipérazine ne sont que des faibles agonistes en comparaison du glutamate et de l'iboténate ($p < 0,02$, $n = 6$, **Figure 32A**).

Dans le but de réaliser un effet concentration du glutamate et de l'iboténate, les ovocytes exprimant Pun-GLC-5 ont été perfusés avec une gamme de concentration allant de 1 à 1000 μM pour le glutamate et de 1 à 300 μM pour l'iboténate. L'amplitude de courant maximum est obtenue à partir de 100 μM de glutamate ce qui est similaire à ce qui est observé pour la sous-unité GLC-5 d'*H. contortus* (231). La courbe d'effet concentration a permis le calcul d'une EC_{50} pour le glutamate de $5,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$ avec un coefficient de Hill calculé de $2,8 \pm 0,8$ ($n = 6$) suggérant la présence de plus de deux sites de liaison sur le récepteur. L' EC_{50} calculée pour l'iboténate est de $21,6 \pm 2,6 \mu\text{M}$ avec un coefficient de Hill calculé de $1,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ($n = 10$) (**Figure 32B**).

Afin d'évaluer la sélectivité ionique de Pun-GLC-5, le potentiel d'inversion a été déterminé après activation par le glutamate en réalisant un protocole voltage-ramp avec différentes concentrations de sodium et de chlore dans la solution de Ringer (**Figure 32C**). Ensuite, les potentiels d'inversion mesurés dans chaque condition ont été placés sur un graphique en fonction de la concentration en sodium ou en chlore. Le décalage négligeable du potentiel d'inversion lorsque la concentration en sodium augmente ($E_{\text{rev}} = -2,4 \text{ mV} \pm 0,66 \text{ mV}$, $n = 6$) comparé au décalage du potentiel d'inversion lorsque la concentration en chlore augmente ($E_{\text{rev}} = -39,15 \text{ mV} \pm 1,5 \text{ mV}$, $n = 6$) montre que Pun-GLC-5 forme un canal perméable au chlore et pas au sodium (**Figure 32D**), ce qui est en accord avec ce qui est décrit pour les GluCl dans la littérature (121,204,207).

Pour résumer, Pun-GLC-5 forme un récepteur homomérique fonctionnel perméable au chlore et sensible au glutamate et à l'iboténate

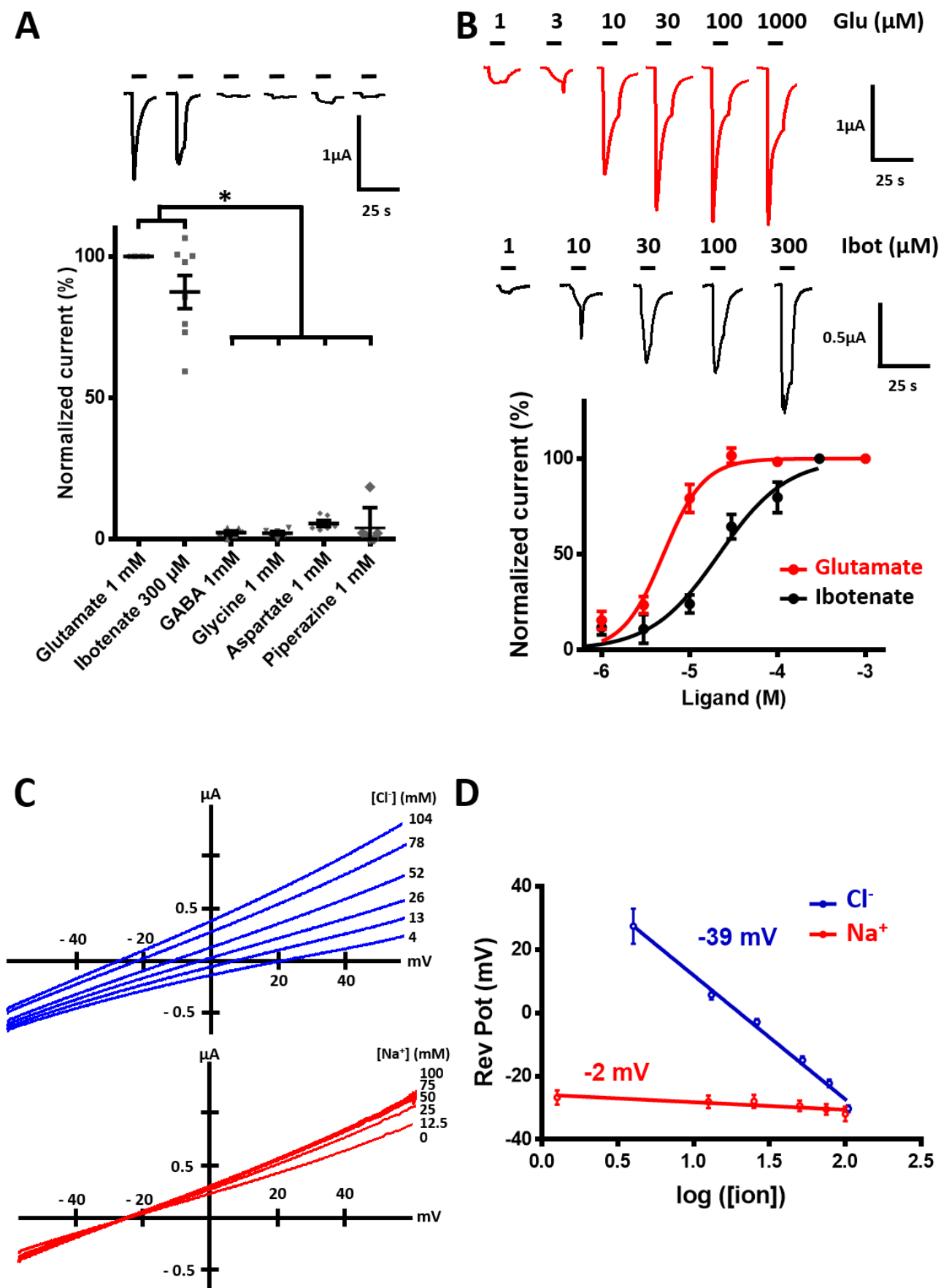


Figure 32: Expression fonctionnelle de la sous-unité GLC-5 de *P. univalens* dans des ovocytes de *Xenopus laevis*.

- A. Effet des analogues structuraux du glutamate (iboténate, GABA, glycine et aspartate) et de l'anthelminthique pipérazine sur des ovocytes de xénope injectés avec les ARNc de *Pun-glc-5*. Les réponses sont normalisées par rapport à une première application de glutamate à 1 mM et les tracés représentatifs des courants de chaque molécule sont affichés au-dessus du graphique. Les ovocytes ont un potentiel imposé de -80 mV. Les analyses statistiques des différences d'amplitudes de courants induites par chaque molécule sont réalisées avec un test de Kruskal-Wallis avec ajustement Bonferroni (* $p < 0,02$).
- B. Courbes effets concentrations pour le glutamate et l'iboténate sur Pun-GLC-5 avec leurs courants représentatifs suite à une application croissante de la molécule allant de 1 à 1000 μ M. L' EC_{50} calculée pour le glutamate est de $5 \pm 0,6 \mu$ M avec un coefficient de Hill de $2,8 \pm 0,8$ ($n = 6$) et celle pour l'iboténate est de $21,6 \pm 2,6 \mu$ M avec un coefficient de Hill de $1,4 \pm 0,4$ ($n = 10$). Les données sont normalisées par rapport à l'effet maximum obtenu avec 1 mM de glutamate ou 300 μ M d'iboténate.
- C. Courbes courant-voltage représentatives d'ovocytes de xénope exprimant Pun-GLC-5 suite à la réalisation d'un protocole voltage-ramp (-60 mV à +60 mV) après application de glutamate avec augmentation de la concentration en sodium ou en chlore dans le milieu extracellulaire.
- D. Sélectivité ionique de Pun-GLC-5. La relation entre le potentiel d'inversion et la concentration ionique du milieu extérieur est obtenue en appliquant le protocole voltage-ramp après application de glutamate et en faisant varier la concentration de sodium ou de chlore sur des ovocytes exprimant Pun-GLC-5. Le décalage du potentiel d'inversion (-39 mV) lorsque la concentration de chlore change indique que Pun-GLC-5 forme un récepteur doté d'un canal sélectif au chlore.

Une large gamme de lactones macrocycliques active Pun-GLC-5

Dans le but de déterminer l'effet des MLs sur Pun-GLC-5, celles ayant une autorisation de commercialisation (abamectine, doramectine, émamectine, éprinomectine, ivermectine, moxidectine et sélamectine) ont été appliquées sur des ovocytes exprimant Pun-GLC-5. Les enregistrements de courants (**Figure 33A**) montrent que toutes les MLs testées sont de puissants agonistes quand elles sont appliquées sur les œufs de xénope (**Figure 33B**). En effet, l'application des MLs à 1 μM pendant 5 s conduit à une lente ouverture des récepteurs dont l'activation est irréversible. Bien qu'il n'y ait que peu ou pas de différences significatives entre les MLs dans leur rapidité d'activation (**Figure 33B**), l'ivermectine et la moxidectine, qui sont les deux seules MLs autorisées pour traiter les chevaux en France (ANSES, Index des médicaments vétérinaires autorisés en France), semblent être les plus rapides d'activation sur Pun-GLC-5. L'ivermectine a significativement une meilleure rapidité d'action sur Pun-GLC-5 que l'émamectine, l'éprinomectine, la sélamectine et l'abamectine ($p < 0,05$). Afin de mieux caractériser l'action de l'ivermectine sur ce récepteur, une courbe d'effet concentration a été réalisée à la suite de l'application de concentration croissante d'ivermectine (allant de 30 nM à 30 μM) (**Figure 33C**). L'ivermectine active le récepteur de façon concentration dépendante avec une EC_{50} de $1,055 \pm 0,131 \mu\text{M}$ et un coefficient de Hill estimé à $3,2 \pm 1,8$ ($n > 5$) (**Figure 33D**).

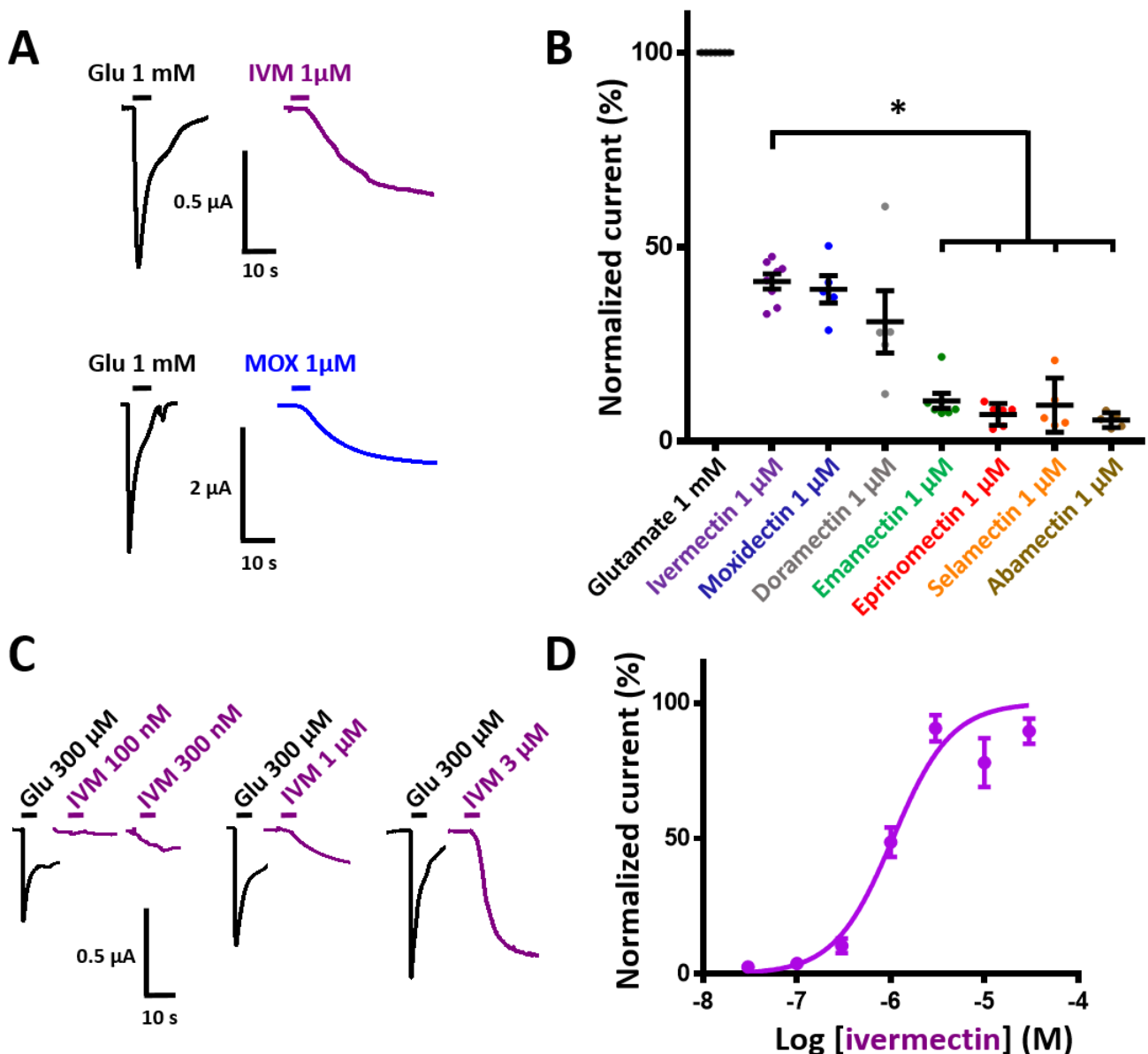


Figure 33: Pun-GLC-5 est sensible à une large gamme de lactones macrocycliques

- Courants représentatifs induit par l'application d'ivermectine ou de moxidectine à 1 μ M en comparaison à une première application de glutamate à 1 mM. Les temps d'application des molécules sont indiqués par les barres horizontales.
- Histogramme représentant les amplitudes de courants normalisées suite à l'application d'une large gamme de MLs (ivermectine, moxidectine, doramectine, émamectine, éprinomectine, sélamectine et abamectine) à 1 μ M pendant 5 s. Les courants sont normalisés par rapport au courant maximum induit par une concentration saturante de glutamate (1 mM). Les résultats représentent la moyenne $\pm$ SEM (n = 5-10). Les analyses statistiques entre les moyennes d'amplitude des courants sont réalisées avec un test de Kruskal-Wallis avec ajustements Bonferroni (* p < 0,05).
- Courants représentatifs obtenus suite à l'application de différentes concentrations d'ivermectine (100 nM-3 μ M).
- Courbe de l'effet concentration de l'ivermectine (30 nM – 30 μ M) sur Pun-GLC-5. La réponse de l'ivermectine est normalisée par rapport à la réponse obtenue avec une première application de glutamate à 300 μ M. A cause de l'effet irréversible de l'ivermectine, un œuf exprimant Pun-GLC-5 n'est perfusé qu'avec une seule concentration d'ivermectine. L' EC_{50} calculée pour l'ivermectine est de 1,055 $\pm$ 0,131 μ M avec un coefficient de Hill de 3,2 $\pm$ 1,8 (moyenne $\pm$ SEM, n = 5-10)

Localisation de l'expression du promoteur de *Pun-glc-5* lorsqu'il est injecté dans *C. elegans*

Les différentes sous-unités de GluCls sont largement distribuées chez *C. elegans* (17,207,236,240) avec des localisations dans les neurones de la tête, les neurones moteurs, le pharynx... Cependant, ils présentent des distributions différentes par rapport aux sous-unités homologues d'*H. contortus* (237), suggérant que la localisation des sous-unités de GluCl est espèce-dépendante. Pour déterminer la localisation de *Pun-glc-5*, une construction, contenant la GFP dont l'expression est contrôlée par 3 kb de séquences en amont du codon d'initiation de la traduction (correspondant au promoteur de *Pun-glc-5*), a été injectée dans les gonades de jeunes adultes de *C. elegans*. L'expression de la GFP a été observée sur 4 vers adultes et une larve L4. La construction *promPun-glc-5 ::GFP* est exprimée dans des neurones présents dans la tête et autour du pharynx, dans la vulve et dans la queue (**Figure 34**). Par sa localisation dans le système nerveux et la vulve, nous avons émis l'hypothèse que *Pun-glc-5* peut potentiellement être impliquée dans la locomotion et la reproduction.

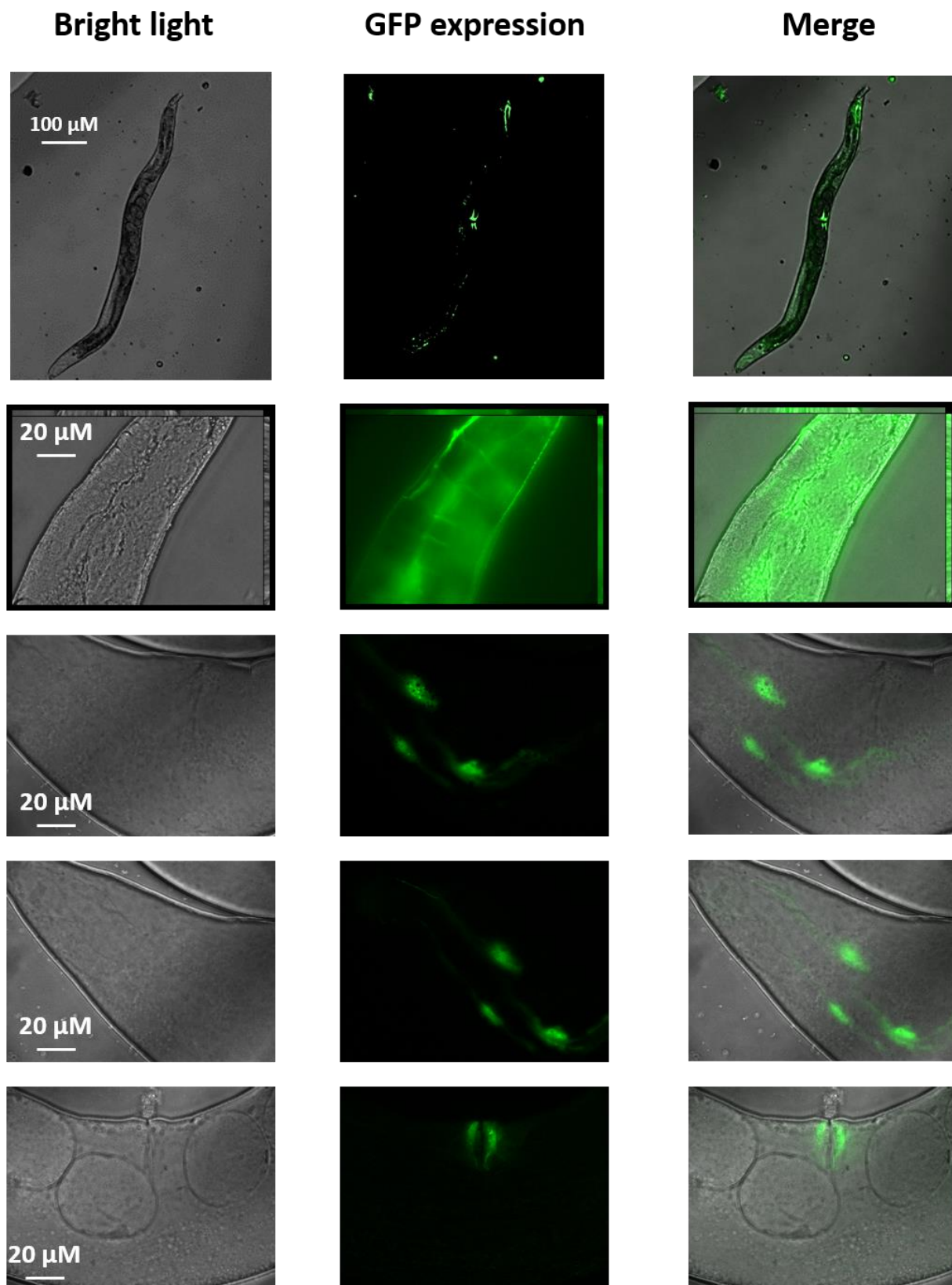


Figure 34: Localisation de l'expression du promoteur de *Pun-glc-5* dans des vers adultes de *C. elegans*

Une construction contenant la GFP a été construite de façon que son expression soit contrôlée par le promoteur de *Pun-glc-5* (3 kb en amont du codon d'initiation de la traduction ont été clonées avant la GFP). Les images sont représentatives de l'expression de la GFP dans différents tissus d'un ver adulte. La GFP est exprimée dans les neurones de la tête, les neurones entourant le pharynx, dans la vulve et dans la queue. La première ligne d'images représente un ver entier tandis que les autres lignes représentent différentes parties du ver à plus fort grossissement. L'échelle pour chaque ligne d'images est représentée par une barre blanche sur l'image la plus à gauche.

Pun-GLC-5 restaure la sensibilité à l'ivermectine quand le récepteur est exprimé dans une souche de *C. elegans* résistante à l'ivermectine

In vitro, dans le système d'expression hétérologue œuf de xénope, Pun-GLC-5 est activé par une large gamme de MLs. Pour confirmer que ce récepteur est également ciblé par les MLs *in vivo*, une construction composée du promoteur et de la séquence codante de *Pun-glc-5* a été injectée dans une souche de *C. elegans* très résistante à l'ivermectine (JD369, quadruple mutant de 4 gènes codant pour des sous-unités de GluCl_s : *avr-14*, *avr-15*, *glc-1* et *glc-3*). Ensuite, des tests de mobilités (thrashing assays) ont été réalisés sur des souches recombinantes après exposition à de l'ivermectine à 150 nM. Après 10 min d'exposition, le nombre de mouvements de chaque ver est compté pendant 30 s. Dans du milieu M9 ne contenant pas d'ivermectine, les trois souches testées effectuent le même nombre de mouvements ($p = 1$). En présence d'ivermectine, les mouvements du quadruple mutant JD369 ne sont pas affectés tandis que ceux de la souche sauvage N2 sont partiellement ou complètement inhibés. Une fois exposée à l'ivermectine, la souche recombinante injectée avec le promoteur et la séquence codante de *Pun-glc-5* est partiellement paralysée voir totalement paralysée pour certains vers. En effet, 31 % des vers recombinants sont complètement paralysés tandis que 63 % ne le sont que partiellement et 6 % se meuvent librement. Le nombre de mouvements de la souche résistante à l'ivermectine JD369 est significativement différent du nombre de mouvements réalisé par la souche N2 ($p < 0,001$) et la souche recombinante ($p < 0,001$) tandis qu'il n'y a pas de différence entre la souche N2 et la souche recombinante ($p = 1$) (**Figure 35**). Ainsi, Pun-glc-5 restaure la sensibilité à l'ivermectine d'une souche résistance.

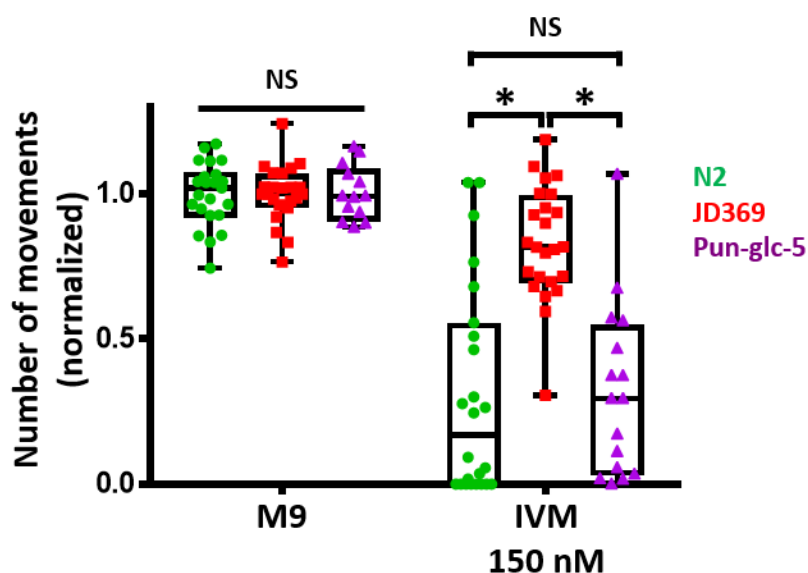


Figure 35: Tests de mobilité montrant la restauration de la sensibilité à l'ivermectine par *Pun-glc-5* (promoteur et séquence codante) lorsqu'elle est exprimée dans la souche résistante à l'ivermectine JD369

Les tests de mobilités sont réalisés sur des adultes de génération F1. Le nombre de mouvements est compté pendant 30 s après 10 min d'exposition à du milieu M9 ou à de l'ivermectine à 150 nM. Le graphique représente les résultats de deux expériences indépendantes (moyenne +/- SEM). Les analyses statistiques sont réalisées avec des T-tests non appariés (* $p < 0,001$, NS = Non Significatif)

Modélisation par homologie de GLC-5 de *P. univalens* et *H. contortus*

Dans le but de mieux comprendre les interactions entre les ligands et les récepteurs, des modèles d'homologie pour les récepteurs GLC-5 de *P. univalens* et d'*H. contortus* ont été générés. La structure 3D des homodimères a été modélisée en utilisant la sous-unité GLC-1 de *C. elegans* (3RIF) comme modèle. En effet, cette sous-unité a été cristallisée et les sites de liaison au glutamate et à l'ivermectine avaient pu être définis (204). De plus, GLC-1 a été choisie comme modèle pour sa forte similarité avec les récepteurs GLC-5, permettant une meilleure comparaison.

Le glutamate se fixe au niveau de l'homodimère Pun-GLC-5 selon une conformation étendue (**Figure 36A**). Comparée à la structure cristallisée de Cel-GLC-1 (**Figure 36G**), nous observons que les mêmes résidus d'acides aminés impliqués dans le site de liaison sont localisés à des distances appropriées pour permettre aux interactions avec le ligand de se faire (**Figure 36A**). Les résidus d'acides aminés importants pour cette liaison pour Pun-GLC-5 sont R88, S151, T225, T227 et Y230. Aussi, nous observons que le glutamate se fixe avec son groupement amine orienté vers le résidu Y230. La tyrosine correspondante chez Cel-GLC-1 (Y200) a été montrée comme participant à l'interaction pi-cationique avec ce groupement amine (204). Ainsi, nous pouvons en déduire que Y230 dans le modèle Pun-GLC-5 agit de la même manière. De la même façon, l'extrémité carboxyle est orientée en direction des résidus proches R88 et S151, et à distance appropriée pour permettre une interaction hydrogène et/ou ionique. En comparant la fixation du glutamate sur le site de liaison de Hco-GLC-5, nous observons une orientation du glutamate similaire avec les mêmes résidus impliqués dans les interactions pi-cationiques (Y234) et les interactions hydrogènes et/ou ioniques (**Figure 36B**).

Concernant le site de fixation de l'iboténate sur les homodimères de Pun-GLC-5 et d'Hco-GLC-5, nous remarquons que la molécule a une orientation courbée qui est plus prononcée pour Hco-GLC-5 (**Figure 36C** et **Figure 36D**). Les groupements amines de l'iboténate sont localisés dans les 4 Å des résidus Y230 de Pun-GLC-5 et Y234 d'Hco-GLC-5 permettant aux interactions pi-cationiques potentielles de se faire. De plus, le groupement carboxyle de l'iboténate est orienté à une distance appropriée pour interagir avec les résidus sérine et arginine (S151 et R88) pour l'homodimère Pun-GLC-5 (**Figure 36C**). L'orientation courbée de l'iboténate dans le récepteur Hco-GLC-5 le place à plus grande distance des résidus sérine et arginine et ne permet donc pas de confirmer de potentielles interactions. Cependant, des mesures d'électrophysiologie en œufs de xénope exprimant Hco-GLC-5 ont montré que ce récepteur était bien activé par l'iboténate (231), ce qui montre les limites de ce modèle de modélisation. Pour comparer avec Cel-GLC-1, l'interaction de l'iboténate a été modélisée en s'appuyant sur la structure précédemment cristallisée 3rhv. Le groupement amine de l'iboténate est localisé dans les 4 Å du résidu Y200 ce qui est cohérent avec les sites de liaison de l'iboténate observés pour GLC-5. Le groupement carboxyle de l'iboténate est orienté d'une façon similaire pour Cel-GLC-1 en comparaison de Pun-GLC-5. Ici, le groupement carboxyle est retrouvé dans les 3 Å des résidus S121 et R56 permettant à des interactions potentielles de se faire.

La différence la plus notable entre les homodimères Pun-GLC-5 et Hco-GLC-5 est l'orientation du résidu thréonine dans la boucle C (T227 pour Pun-GLC-5 et T231 pour Hco-GLC-5) (**Figure 36A** et **Figure 36B**). Cependant, dans ces deux conformations, T227 et T231 étaient capables d'interagir avec le glutamate comme cela a aussi été observé dans la structure cristallisée de Cel-GLC-1.

Concernant la liaison à l'ivermectine sur les homodimères Pun-GLC-5 et Hco-GLC-5, nous remarquons que l'ivermectine se fixe dans une région similaire dans les récepteurs (entre les TM1 et TM3), mais n'est pas autant profondément enchâssée entre les domaines transmembranaires comme c'est le cas dans la structure cristallisée de Cel-GLC-1 (**Figure 36H**). De plus, en comparaison à la structure cristallisée de Cel-GLC-1, le site de fixation de l'ivermectine sur GLC-5 des deux parasites est dans une orientation retournée. Ces différences de site de fixation peuvent être expliquées par la grande taille de l'ivermectine et par des interactions plus complexes qui ne sont pas simulées dans ces modèles. Ces mêmes sites de fixations ont également été observés en utilisant d'autres structures cristallisées de Cel-GLC-1 comme modèle (3RAI, 3RI5 et 3RHW) pour générer ces modèles de GLC-5. De plus, la structure cristallisée de Cel-GLC-1 présente des résidus clefs (L217, Q219, I222, N264, M284, T285 et F288) qui interagissent avec l'ivermectine ou avec les résidus environnants (**Figure 36H**). En regardant l'alignement de Cel-GLC-1, Pun-GLC-5 et Hco-GLC-5 de la **Figure 29**, nous remarquons que la thréonine en position 285 pour Cel-GLC-1 est une alanine pour Pun-GLC-5 (A315) et Hco-GLC-5 (A319). De plus, M284 pour Cel-GLC-1 est L314 pour Pun-GLC-5 et L318 pour Hco-GLC-5.

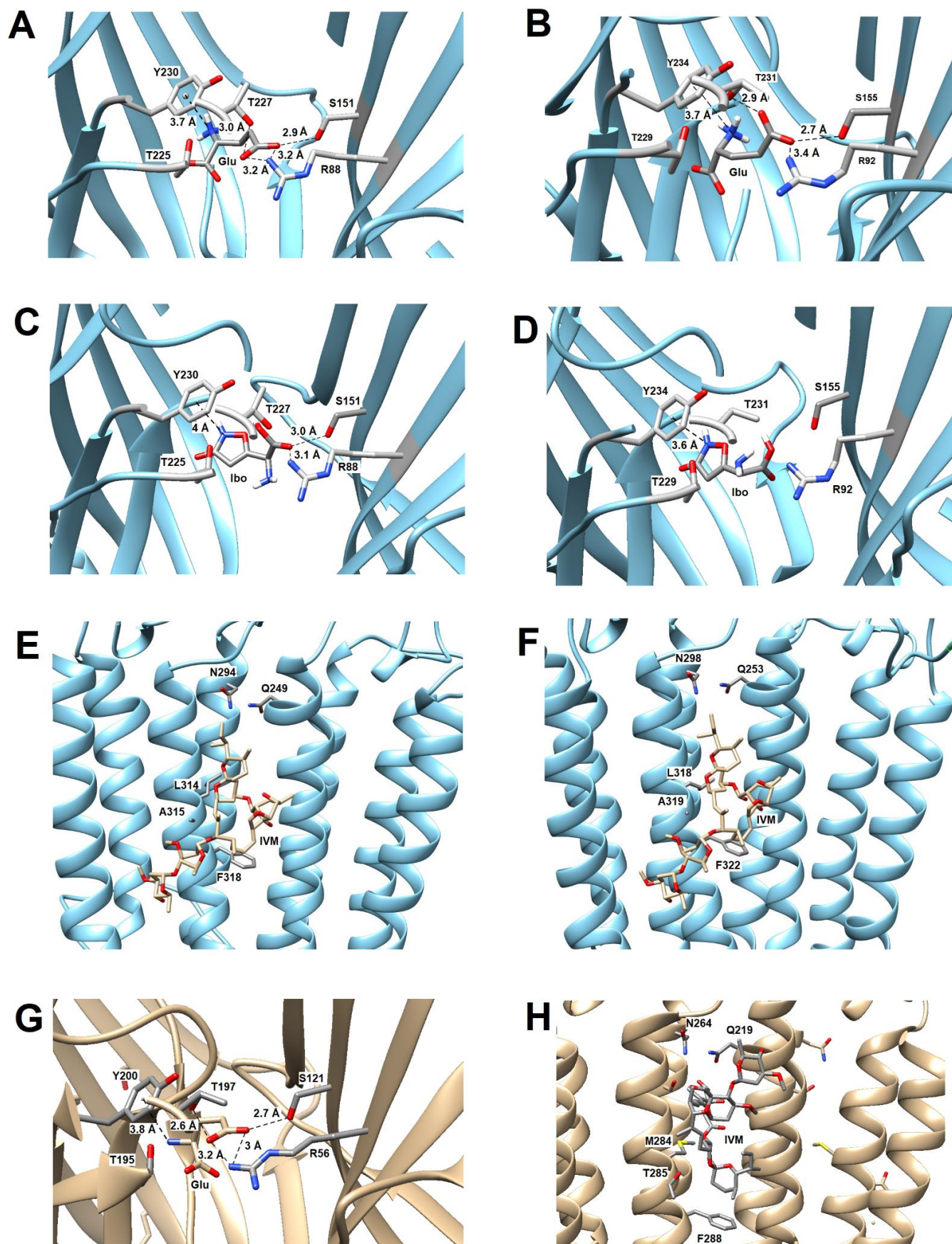


Figure 36: Modélisation par homologie de GLC-5 avec liaison au glutamate, à l'iboténate et à l'ivermectine

- A. Modèle d'homologie du site de liaison du glutamate sur l'homodimère Pun-GLC-5. Les résidus d'acides aminés clefs impliqués dans les interactions ligands-récepteurs sont indiqués. Une portion de la boucle C (loop C) a été enlevée pour améliorer la clarté de l'image.
- B. Modèle d'homologie du site de liaison du glutamate sur l'homodimère Hco-GLC-5.
- C. Site de liaison de l'iboténate sur Pun-GLC-5.
- D. Site de liaison de l'iboténate sur Hco-GLC-5.
- E. Région transmembranaire de l'homodimère Pun-GLC-5 avec les sites de liaison de l'ivermectine. Les résidus d'acides aminés clefs impliqués dans la liaison ligand-récepteurs sont indiqués.
- F. Région transmembranaire de l'homodimère Hco-GLC-5 avec les sites de liaison de l'ivermectine.
- G. Structure cristallisée du récepteur Cel-GLC-1 avec les sites de liaison du glutamate. Les résidus d'acides aminés clefs impliqués dans la liaison au glutamate sont indiqués.
- H. Structure cristallisée du récepteur Cel-GLC-1 avec les sites de liaison de l'ivermectine. Les résidus d'acides aminés clefs impliqués dans la liaison à l'ivermectine sont indiqués.

DISCUSSION

Pour cette partie de mon projet de thèse, nous nous sommes focalisés sur la sous-unité GLC-5 de *P. univalens* qui forme des récepteurs homomériques fonctionnels lorsqu'elle est exprimée en œufs de xénope. La recherche dans les bases de données de séquences homologues de GLC-5 d'*H. contortus* (229–232) a permis d'identifier des séquences homologues chez 14 espèces de nématodes sur les 105 génomes disponibles. Ces résultats révèlent que GLC-5 est une sous-unité rare chez les nématodes bien qu'elle soit retrouvée chez des espèces de nématodes de clades différents et donc relativement éloignées phylogénétiquement. Parmi les sous-types de GluClIs décrits, GLC-5 semble le sous-type le plus sensible au glutamate avec des EC₅₀ enregistrées de 8 µM pour *H. contortus* (231) et 5 µM pour *P. univalens* suggérant un rôle très important dans la neurotransmission si cette sensibilité est confirmée *in vivo* (18,208). L'application des lactones macrocycliques disponibles sur le marché sur les œufs de xénope exprimant Pun-GLC-5 a montré qu'elles agissent toutes comme agonistes. Dans cette étude, l'ivermectine et la moxidectine étaient les deux MLs les plus efficaces pour activer ce récepteur. Il est intéressant de noter que l'ivermectine et la moxidectine sont les deux seules MLs ayant une autorisation d'utilisation pour traiter les infestations de *Parascaris sp.* (ANSES – Index des médicaments vétérinaires autorisés en France) suggérant que GLC-5 est leur cible préférentielle parmi les GluClIs et expliquerait leur forte efficacité contre ce parasite par rapport aux autres MLs.

L'expression du promoteur de *glc-5* de *P. univalens* contrôlant l'expression de la GFP dans des jeunes adultes de *C. elegans* a permis de montrer la large distribution de cette sous-unité dans des neurones de la tête, des neurones entourant le pharynx, la vulve, et dans la queue du nématode. Chez *H. contortus*, des expériences d'immunofluorescence en utilisant des anticorps spécifiques ont montré que Hco-GLC-5 est localisée au niveau des commissures de neurones moteurs ce qui correspondrait à ce qui est observé pour le promoteur de *Pun-glc-5*, mais aucune expression n'a été observée dans la vulve ou dans la queue (237). Cette différence de localisation d'expression peut s'expliquer par les différentes approches utilisées (utilisation d'anticorps directement sur le parasite versus expression de promoteur dans un système d'expression hétérologue) ou par les différences d'expression de *glc-5* chez différentes espèces de nématodes. Une telle différence d'expression a été observée pour la sous-unité *avr-14*

qui est une sous-unité très conservée chez les nématodes (223). En effet, chez *A. suum*, *B. malayi* et *H. contortus*, *avr-14* n'est pas localisée dans les mêmes tissus et semble dépendre de l'espèce de nématodes (224,234,237).

Avec une telle localisation, nous pouvons supposer que Pun-GLC-5 peut avoir un rôle dans la locomotion, dans des fonctions pharyngales et dans la ponte des œufs. Des tests de mobilité sur des *C. elegans* résistants à l'ivermectine dans lesquels Pun-GLC-5 a été injectée ont permis de restaurer la sensibilité à l'ivermectine, confirmant que GLC-5 en est bien la cible *in vivo* en plus de suggérer un rôle de GLC-5 dans la locomotion. Cependant, les hypothèses que le récepteur GLC-5 est impliqué dans des fonctions pharyngales et dans la ponte restent encore à être étudiées. Actuellement, la culture et la transformation génétique de *Parascaris sp.* n'ont pas encore été mises au point. Dans ce sens, *C. elegans* est un modèle alternatif intéressant pour valider ces hypothèses. En effet, des tests de ponte et de développement larvaire ont précédemment été mis au point (18) et pourraient être envisagés par la suite. De même, l'évaluation de la fréquence de pompage du pharynx par des mesures visuelles et/ou des mesures d'électrophysiologie pourront confirmer ou non l'implication de GLC-5 dans ces processus pharyngaux (301,302).

Ensemble, ces résultats montrent que GLC-5 est une cible pharmacologique des MLs et en font une cible pertinente pour le criblage de potentiel nouveaux anthelminthiques contre les nématodes parasites des équins (303).

III. Identification et caractérisation des cibles pharmacologiques de l'ivermectine et du lotilaner chez le pou de corps humain *Pediculus humanus humanus* – Nouvelles perspectives de traitement des pédiculoses

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *PLoS Pathogens* le 18/02/2021. Cette production a pour titre « The molecular targets of ivermectin and lotilaner in the human louse *Pediculus humanus humanus* – new prospects for the treatment of pediculosis » ([10.1371/journal.ppat.1008863](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008863)).

Première version avant correction accessible sur BioRxiv (doi.org/10.1101/2020.08.06.239400)

CONTEXTE

Les poux humains (*Pediculus humanus*) ont une répartition mondiale et impactent des millions de personnes chaque année (66). Les infestations de poux ont un impact sociétal car souvent associées aux enfants et aux personnes vivants dans de mauvaises conditions d'hygiène (guerre, famine, sans abris). Ils ont également un impact économique avec un coût lié aux contrôles des infestations estimé à 1 milliard de dollars par an rien qu'aux Etats Unis (86). A l'inverse des poux de tête (*Pediculus humanus capitis*), les poux de corps (*Pediculus humanus humanus*) sont un sérieux problème de santé publique car ils sont vecteurs de plusieurs bactéries responsables de maladies pouvant être létales telles que *Rickettsia prowazekii* responsable du typhus exanthématique, *Bartonella quintana* responsable de la fièvre des tranchées et *Borrelia recurrentis* responsable de la fièvre récurrente à poux (71). Associés à une résistance toujours plus importante des bactéries face aux antibiotiques, les poux de corps représentent un grand risque de santé dans les zones à risques (zone de guerre, famine...) qui sont plus susceptibles de revoir apparaître ces maladies. De plus, le contrôle des infestations de poux de corps est de plus en plus difficile à cause des résistances aux traitements tels que ceux à base de lindane (304), malathion (90) ou de pyréthrine/pyréthroides (77,87,88). De plus, des effets neurotoxiques chez l'enfant et des effets toxiques pour l'environnement ont été rapportés pour certaines molécules (lindane, malathion) (93,94). L'ivermectine est une molécule ne présentant que peu d'effets secondaires et est beaucoup utilisée en médecine humaine et vétérinaire en tant que nématocide, insecticide et acaricide. Par conséquent, l'ivermectine est rapidement devenue la molécule de référence pour traiter les infestations de poux de corps (98). Cependant, la présence de poux résistants à l'ivermectine a déjà été rapportée (104,105) ce qui rend le développement de nouvelles molécules à effet pédiculicide urgente. Les cibles pharmacologiques majeures des insecticides sont les canaux ioniques ligand-dépendant (LGICs) présents dans le système nerveux des insectes (272). Pour les insectes, le mode d'action de l'ivermectine a été étudié sur l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* ce qui a permis de mettre en évidence son action sur les canaux chlorure glutamate-dépendant (GluCl) (206). De même, le criblage de mutants de drosophiles résistants à la dieldrine et au fipronil a permis d'identifier le récepteur au GABA, RDL (resistant to dieldrin), comme une cible pharmacologique majeure (305,306). Cependant, au début de cette thèse, ces cibles pharmacologiques restaient largement méconnues chez le pou.

OBJECTIFS

Les objectifs de cette étude ont été d'évaluer l'efficacité pédiculicide de molécules insecticides (fipronil, picrotoxine, ivermectine et lotilaner) puis d'identifier et de caractériser les cibles pharmacologiques de ces molécules au niveau moléculaire.

METHODES

Les évaluations des effets pédiculicides du fipronil, de la picrotoxine, de l'ivermectine et du lotilaner ont été réalisées par des tests de toxicité *in vivo* en appliquant les molécules directement sur une quarantaine de poux adultes ou sur une centaine de lentes pour chaque condition. Le taux de mortalité et la capacité à se mouvoir des poux adultes ainsi que le taux d'éclosion des œufs ont été évalués visuellement au cours du temps (de t0 à t24h).

L'ivermectine et le lotilaner ont été décrits comme ciblant respectivement les GluCl_s et les récepteurs au GABA chez *D. melanogaster*. En utilisant une approche gène candidat, les séquences codant les sous-unités de GluCl_s et les récepteurs au GABA de *Pediculus humanus humanus* ont dans un premier temps été identifiées en réalisant des BLAST sur les bases de données génomiques. La séquence codante complète de chaque sous-unité a été amplifiée par PCR puis clonée dans un vecteur de transcription afin de réaliser la synthèse *in vitro* des ARNc correspondants. Les ARNc ont été injectés dans le système d'expression hétérologue d'ovocytes de *Xenopus laevis* afin de réaliser la caractérisation fonctionnelle des sous-unités et d'étudier le mode d'action des insecticides sur ces récepteurs par la technique de voltage clamp à double électrodes.

RESULTATS

Les tests de toxicité ont montré que le fipronil, l'ivermectine et le lotilaner avaient un effet pédiculicide sur les poux adultes mais pas sur les lentes. La picrotoxine n'a pas montré d'effet pédiculicide. De plus, le lotilaner agit rapidement sur les poux (3h) avec des concentrations requises plus faibles que pour les autres molécules (y compris l'ivermectine qui est la molécule de référence) pour tuer 100% des poux (**Figure 1**).

Deux séquences codantes complètes ont été identifiées pour la sous-unité GluCl (Phh-GluCl-1 et Phh-GluCl-2) ainsi que pour la sous-unité RDL (Phh-RDL-1 et Phh-RDL-2) (**Figure 2**). Les mesures d'électrophysiologie en œufs de xénope ont montré que seuls GluCl-1 et RDL-1 formaient des récepteurs homomériques fonctionnels perméables au chlore. Ces deux récepteurs sont activés par leurs ligands naturels respectifs que sont le glutamate et le GABA avec des EC₅₀ de 9,3 µM pour Phh-GluCl et 16 µM pour Phh-RDL (**Figure 3**). A l'inverse, l'application de glutamate ou de GABA sur GluCl-2 et RDL-2 n'a pas permis l'enregistrement de courants (**Figure S3**).

La caractérisation pharmacologique des deux récepteurs a montré que l'ivermectine avait un effet d'agoniste irréversible sur Phh-GluCl avec une EC₅₀ calculée de 78 nM (**Figure 4A, B**) et a un effet antagoniste sur RDL avec une IC₅₀ calculée de 342 nM (**Figure 5C**). A l'inverse, le lotilaner n'a pas montré d'activité agoniste ou antagoniste sur Phh-GluCl-1 (**Figure 4C, D**) tandis qu'il agit comme un inhibiteur non compétitif très puissant sur Phh-RDL-1

avec une IC_{50} de 40,7 nM (**Figure 5 et 6**). Les effets doses antagonistes du fipronil et de la picrotoxine ont permis de calculer des IC_{50} de 137,5 nM et 1,16 μ M respectivement (**Figure 5A, B**).

DISCUSSION

Ce travail a permis de montrer pour la première fois l'effet pédiculicide du lotilaner *in vivo* en l'appliquant sur les poux de corps humains. Par rapport à l'ivermectine, qui est le traitement de référence contre les poux de corps, le lotilaner s'est révélé efficace plus rapidement et à de plus faibles concentrations. Ces résultats apportent la preuve de concept que le lotilaner, et potentiellement les autres molécules de la famille des isoxazolines actuellement utilisées comme médicaments vétérinaires contre les insectes, peuvent être réaffectées comme pédiculicides en médecine humaine (185). Leur faible toxicité pour les mammifères, leur spécificité d'action, leur formulation orale ainsi que leur longue demi-vie (307–310) en ferait des traitements de choix pour traiter les poux de corps. De plus, la résistance aux isoxazolines n'a pas encore été observée et des phénomènes de résistances croisées avec d'autres insecticides sont peu probables du fait que les pédiculicides actuels n'agissent pas sur les mêmes cibles. En effet, bien que RDL soit porteur de mutations de résistance au fipronil et à la dieldrine, ces mutations n'impactent pas l'effet antagoniste des isoxazolines ni *in vitro* ni *in vivo* chez *D. melanogaster* et *M. domestica* (187,198). Cette étude montre le grand potentiel des isoxazolines comme nouveaux agents pédiculicides pour augmenter le nombre de molécules disponibles contre les poux humains et comme alternative pour contrer les phénomènes de résistances observés pour les pédiculicides actuels.

Ce travail a également permis d'identifier et de caractériser les premiers LGICs de poux et d'identifier des cibles pharmacologiques de l'ivermectine et du lotilaner. L'ivermectine a une action préférentielle sur le récepteur au glutamate Phh-GluCl en tant qu'agoniste mais a également un effet à de plus fortes concentrations sur le récepteur au GABA Phh-RDL en tant qu'antagoniste. A l'inverse, le lotilaner n'agit pas sur Phh-GluCl mais a montré un fort effet antagoniste non compétitif sur Phh-RDL. L'identification de cibles pharmacologiques est une étape importante pour le développement de nouveaux traitements antiparasitaires ou pour le criblage de molécules. De plus, des mutations (SNPs) ont été observées sur le GluCl de souches de poux résistantes à l'ivermectine (104,105). L'identification et la caractérisation de Phh-GluCl ouvre la voie à l'étude de la fonctionnalité de chaque SNPs afin de déterminer lesquels sont réellement impliqués dans la résistance à l'ivermectine.

Pour conclure, cette étude apporte une meilleure compréhension du mode d'action de l'ivermectine et du lotilaner sur leurs cibles moléculaires que sont les récepteurs au glutamate (GluCl) et au GABA (RDL), et montre le potentiel des isoxazolines comme nouveaux agents pédiculicides pour augmenter le nombre de molécules disponibles et potentiellement casser la transmission de poux résistants.

ARTICLE: THE MOLECULAR TARGETS OF IVERMECTIN AND LOTILANER IN THE HUMAN LOUSE *PEDICULUS HUMANUS HUMANUS* – NEW PROSPECTS FOR THE TREATMENT OF PEDICULOSIS

Nicolas Lamassiaude¹, Berthine Toubate², Cédric Neveu¹, Pierre Charnet³, Catherine Dupuy², Françoise Debierre-Grockie², Isabelle Dimier-Poisson^{2*} and Claude L. Charvet^{1*}

¹INRAE, Université de Tours, ISP, F-37380, Nouzilly, France

²Université de Tours, INRAE, ISP, F-37000, Tours, France

³Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR5247, CNRS, Université de Montpellier, 34095 Montpellier, France

Publication dans PLoS Pathogens le 18/02/2021 ([10.1371/journal.ppat.1008863](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008863))

Première version avant correction accessible sur BioRxiv (doi.org/10.1101/2020.08.06.239400)

Journal: *PLoS Pathogens*

Full title:

The molecular targets of ivermectin and lotilaner in the human louse *Pediculus humanus humanus* – new prospects for the treatment of pediculosis

Short title:

Molecular targets of insecticides in the human louse

Nicolas Lamassiaude¹, Berthine Toubate², Cédric Neveu¹, Pierre Charnet³, Catherine Dupuy², Françoise Debierre-Grockiego², Isabelle Dimier-Poisson^{2,*} and Claude L. Charvet^{1,*}

¹INRAE, Université de Tours, ISP, F-37380, Nouzilly, France

²Université de Tours, INRAE, ISP, F-37000, Tours, France

³Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR5247, CNRS, Université de Montpellier, 34095 Montpellier, France

Co-corresponding authors:

* claud.charvet@inrae.fr (CLC) ORCID iD: [0000-0002-0596-6598](https://orcid.org/0000-0002-0596-6598)

Tel: +33 247427567

Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

UMR1282 - Infectiologie et Santé Publique

Centre de Recherche Val de Loire

37380 Nouzilly, France

* isabelle.poisson@univ-tours.fr (IDP) ORCID iD: [0000-0001-8917-4493](https://orcid.org/0000-0001-8917-4493)

Tel: +33 247367183

Université de Tours

UMR1282 - Infectiologie et Santé Publique

37000 Tours, France

Abstract

Background

Control of infestation by cosmopolitan lice (*Pediculus humanus*) is increasingly difficult due to the transmission of resistant parasites to pediculicides. However, since the targets for pediculicides have not been identified in human lice so far, their mechanism of action remains largely unknown. The macrocyclic lactone, ivermectin is active against a broad range of insects including human lice. Isoxazoline is a new chemical class preferentially targeting the γ -aminobutyric acid (GABA) receptor made of the resistant to dieldrin (RDL) subunit and exhibiting a strong insecticidal potential. To a lesser extent, isoxazoline targets glutamate-gated chloride channels (GluCl) in a species dependent manner. Here, we addressed the pediculicidal potential of isoxazoline and deciphered the molecular targets of ivermectin and the ectoparasiticide lotilaner in the human body louse species *Pediculus humanus humanus*.

Methods and findings

Using toxicity bioassays, we showed that fipronil, ivermectin and lotilaner are efficient pediculicides on adult lice. The RDL (Phh-RDL) and glutamate-gated chloride channel subunits (Phh-GluCl) were cloned and characterized by two-electrode voltage clamp electrophysiology in *Xenopus laevis* oocytes. Phh-RDL and Phh-GluCl formed functional homomeric receptors respectively gated by GABA and L-glutamate with EC_{50} values of 16.0 μ M and 9.3 μ M. Importantly, ivermectin displayed a super agonist action on Phh-GluCl whereas Phh-RDL receptors were weakly affected. Conversely, lotilaner strongly inhibited the GABA-evoked currents in Phh-RDL with an IC_{50} value of 40.7 nM, whereas it had no effect on Phh-GluCl.

Conclusions

We report here for the first time the pediculicidal potential of isoxazoline and reveal the mode of action of ivermectin and lotilaner on GluCl and RDL channels from human lice. These results emphasize the strong potential future of the isoxazoline drug class to provide new pediculicidal agents to tackle resistant-lice infestations in humans.

Keywords:

human body louse, *Pediculus humanus humanus*, insecticide, pediculicide, isoxazoline, lotilaner, ivermectin, GABA receptor, glutamate-gated chloride channel, xenopus oocyte, mode of action

Autorship summary

Why was this study done?

Human cosmopolitan lice are responsible for pediculosis, which represent a significant public health concern. Resistant lice against insecticides and lack of safety of the treatments for human and environment is a growing issue worldwide. Here we investigated the efficacy on lice of the classical macrocyclic lactone drug, ivermectin, and the isoxazoline drug, lotilaner. This study was done to decipher their mode of action at the molecular and functional levels in order to propose new strategies to control lice infestation.

What did the researchers do and find?

Our bioassay results indicate that ivermectin and lotilaner were potent at killing human adult lice, with lotilaner showing a higher efficacy than ivermectin. Furthermore, we identified and pharmacologically characterized the first glutamate- and GABA-gated chloride channels ever described in human lice yet. Mechanistically, our molecular biology and electrophysiology findings demonstrate that ivermectin acted preferentially at glutamate channels while lotilaner specifically targeted GABA channels.

What do these findings mean?

These results provide new insights in the understanding of the insecticide mode of action and highlight the potential of isoxazolines to extend pharmacopea for the treatment of human lice.

Introduction

Lice are spread throughout the world in both low- and high-income countries, with heterogeneous prevalence depending on the geographical area [1, 2]. Pediculosis prevailing among school age children and homeless persons represents major economic, social but also public health concerns [3-8]. Human lice include the body louse *Pediculus humanus humanus* and the head louse *Pediculus humanus capitis* (order: *Phthiraptera*: *Pediculidae*). Both species are obligate blood feeding ectoparasites, living in clothes and in the scalp area, respectively [9]. Despite morphological, physiological and ecological differences, genetic studies showed that head and body lice have almost the same genomic and transcriptomic contents [9-11]. Furthermore, body lice are vectors of the pathogenic bacteria *Bartonella quintana*, *Borrelia recurrentis* and *Rickettsia prowazekii*, responsible for trench fever, louse-borne relapsing fever and epidemic typhus, respectively [4]. The control of lice infestation remains increasingly difficult due to the mode of transmission and the relative unreliable efficacy of the available treatments [12]. Even though silicon-based suffocating products are widely used nowadays, their efficacy largely depends on the respect of their application and is limited against the nits [13]. Chemical insecticides such as organochloride (lindane), organophosphates (malathion), carbamates (carbaryl) and pyrethroids (pyrethrins and synthetic permethrin), which are the first line treatments recommended by the Centers for Disease Control and Prevention and by the American Academy of Pediatrics, have been widely used to control lice [14, 15]. They have been proposed to inhibit γ -aminobutyric acid (GABA)-gated chloride channels, acetylcholinesterase and voltage-gated sodium channels, respectively, leading to the paralysis of the parasite. However, louse resistance to these products has been widely reported [16-19] as well as neurotoxic effects in children and toxicity on the environment [20-25]. Because macrocyclic lactones (MLs) are broad-spectrum neuroactive insecticides, acaricides and nematicides used to treat and prevent endo- and ectoparasites of humans and animals [26], ivermectin (a derivative of the ML avermectins) has emerged as a promising pediculicide and quickly became the recommended molecule for the control of body lice [27-29]. In invertebrates, ivermectin irreversibly activates glutamate-gated chloride channels (GluCl) leading to a reduction in motor activity, paralysis and death. However, the molecular basis for the action of ivermectin in louse is unknown. Recently, treatment failures of ivermectin against lice were observed [30, 31]. In that respect, there is an urgent need to identify new druggable targets and develop new pediculicidal compounds.

Cys-loop ligand-gated ion channels (LGICs) are the major pharmacological targets of insecticides [32]. Among LGICs, the GluCl are found at inhibitory synapses of the nervous system exclusively in invertebrates [33], while γ -aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in nerves and muscles in both vertebrates and invertebrates. GluCl and GABA receptors are constituted by the oligomerization of five identical or different subunits around a central pore [34]. In arthropods, the finding that the insecticidal activity of avermectins is mainly mediated by the GluCl was first achieved in the model insect *Drosophila melanogaster* [35]. For the GABA channels (GABACl), the screening for mutant flies that survive exposure to the insecticides dieldrin and fipronil, allowed the identification of the *resistant to dieldrin* gene or *rdl* [36]. When heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes, the GluCl and RDL subunits formed functional homomeric glutamate-gated and GABA-gated chloride channels, respectively [35, 37]. GluCl and RDL subunits were subsequently described in many other insect species although few of them were functionally assayed *in vitro*. Mutations in the GluCl subunit confers resistance to avermectins, whereas resistance to dieldrin, fipronil and picrotoxinin was shown to be associated to mutations in the RDL subunit using functional *in vitro* and *in vivo* experiments [32].

Interestingly, new synthetic molecules from the isoxazoline chemical class were recently proven to be effective ectoparasiticides against fleas and ticks [38]. The isoxazoline insecticides include fluralaner, afoxolaner, sarolaner and lotilaner [39-42]. They were shown to act as potent non-competitive antagonists of GABACls from *D. melanogaster* as well as the cat flea *Ctenocephalides felis* and the livestock tick *Rhipicephalus microplus* by molecular experiments and voltage-clamp electrophysiology. In a lesser extend, isoxazolines were also shown to act as antagonists of arthropod GluClS [43-45]. In addition, these compounds were efficient at blocking GABA-elicited currents from dieldrin- and fipronil-resistant channels. Recent studies on the actions of these compounds on cloned GABACls have accounted for their higher selectivity for insect over vertebrate receptors [42, 43]. Compounds from the isoxazoline group are now considered as the next generation of broad-spectrum insecticides effective against veterinary, agricultural, sanitary and stored product pests from eleven arthropod orders [46]. However, the pediculicidal activity of isoxazolines, the identification of the target ion channels in lice and their potential use for human health have not been investigated so far.

The objectives of our study were to decipher the molecular targets of ivermectin and lotilaner in the human body louse species *Pediculus humanus humanus* (Phh). In the present paper, we describe in the human body louse: the *in vivo* pediculicidal activity, the target identification and *in vitro* mechanism of action of the phenylpyrazole insecticide, fipronil, the ML insecticide, ivermectin, and the last marketed isoxazoline, lotilaner. For this, we identified the human body louse orthologues of the GluCl and RDL subunit genes and subsequently achieved their respective functional characterizations in *Xenopus* oocytes using two-electrode voltage-clamp. We found that the Phh-GluCl and Phh-RDL subunits give rise to glutamate-gated and GABA-gated homomeric channels having distinct pharmacological properties. Hence, we provide mechanistic insights for a distinct mode of action of ivermectin and lotilaner. In the context of drug-resistance, this study highlights the pediculicidal potential of lotilaner in a drug-repurposing attempt of new strategies to control human louse infestations.

Results

In vivo toxicity tests of ivermectin and lotilaner on lice and nits

In order to determine the efficacy of selected insecticides, we first performed insecticide exposure tests on laboratory-reared human adult body lice and nits (**Fig. 1A**). Briefly, lice were incubated with ivermectin, fipronil, picrotoxin and lotilaner at different concentrations. The effects of the compounds on louse survival and immobilization (knockdown) were subsequently analyzed at four timepoints (1, 2, 3, and 24 hours) (**S2 Table**). After 24h, there was 4.5% mortality in the groups of lice treated with 1% DMSO that was used to dissolve the different compounds (**Fig. 1B**). Similarly, 100 μ M picrotoxin was not efficient to kill the lice after 24h whereas 91% of the lice were killed or immobilized after 24h exposure to 100 μ M fipronil. In our experiments, fipronil was used as a positive control and this result corroborated previous bioassays in the literature [47]. As expected, ivermectin was more efficient than fipronil, since the death rate reached 30%, 3h after application of 100 μ M, and 100% after 24h application of both 10 and 100 μ M (**Fig. 1B**). These findings confirmed the insecticide susceptible status of the laboratory-reared colony used here. Strikingly, after application of 100 μ M lotilaner, the number of living lice declined rapidly. Not only the application of 1 μ M lotilaner killed 14% of lice at 24 h but 10 and 100 μ M lotilaner led to the death of all lice 3h after exposition (**Fig. 1B**). Interestingly, when compared with other drugs, 10 μ M lotilaner was more efficient than 10 μ M ivermectin and

100 μ M fipronil. Next, we analyzed the effect of 100 μ M ivermectin or lotilaner on the nit hatching between six and nine days after drug application. The rate of nits hatched did not differ between the ivermectin- and the lotilaner-treated nits and the negative controls (water and 1% DMSO) thus revealing the lack of efficacy of the two products on the nits (**Fig. 1C**). Altogether, these results confirm that fipronil and ivermectin are efficient at killing human adult body lice and provide the first *in vivo* evidence of a pediculicidal activity for lotilaner. These data prompted us to investigate the targets of ivermectin and lotilaner at the molecular level.

GluCl and RDL subunits are conserved in *P. humanus humanus*

Macrocyclic lactones and isoxazolines were previously shown to act both on arthropod glutamate- and GABA-gated channels. Therefore, we decided to identify and clone the respective *P. humanus humanus* GluCl and RDL subunits through a candidate gene approach. Searches for homologues of *A. mellifera* and *D. melanogaster* GluCl and RDL receptor subunits in *P. humanus* genomic/transcriptomic databanks, allowed the identification of two independent coding sequences for *Phh-GluCl* and for *Phh-rdl* for which the respective complete coding sequences were obtained by RACE PCR experiments. Both louse GluCl and RDL displayed the characteristic features of cys-loop LGIC subunits, including a signal peptide, an extracellular N-terminal domain containing the ligand binding sites, a disulfide bond formed by two cysteines that are 13 amino acid residues apart (cys-loop domain), four transmembrane domains (TM1-TM4) and a large intracellular loop between TM3 and TM4 that is highly variable (**Fig. 2**). Of importance is the sequence analysis of the pore selectivity filter located in the TM2 supporting the prediction with the signature of a chloride channel. Indeed, Phh-GluCl and Phh-RDL both contain the PAR motif centered at the 0' position in the TM2 and conserved in other species (universal LGIC TM2 numbering system). A proline at position -2', followed by a small amino acid at position -1' like an alanine, an arginine at the 0' residue and a threonine at position 13' are the hallmarks of chloride-permeable LGICs [48].

The full-length coding sequences for the GluCl subunits included ORFs of 1353 and 1350 bp encoding proteins of 450 and 449 amino acids that were named Phh-GluCl-1 (MT321070) and Phh-GluCl-2 (MT321071), respectively. The alignment of *Phh-GluCl-1* and *Phh-GluCl-2* deduced amino-acid sequences is provided in **Fig. 2A**. The two sequences are highly conserved with 97% identity and 98% similarity and only differ by eleven amino acid substitutions and an alanine insertion in the N-terminal part at position 59 in Phh-GluCl-1. (**Fig. 2** and **S1 Fig**). Noteworthy, all the amino acids involved in the glutamate binding were conserved.

For RDL subunits, both full-length coding sequences are 1467 nucleotide long encoding 489 amino acids. Phh-RDL-1 (MT321072) and Phh-RDL-2 (MT321073) share 96% identity and 98% similarity, only differing by 20 amino acid substitutions including 17 amino acid changes located in the extracellular N-terminal region between the signal peptide and the TM1 (**Fig. 2A** and **S2 Fig**). Notably, none of the residues involved in the binding of GABA were subjected to substitutions.

Previous study performing docking model and amino acid substitutions shown that several amino acid in TM1, TM2 and TM3 are very important for the fluralaner binding on GABA receptor and GluCl of *Musca domestica* [49, 50]. The corresponding amino acid are highly conserved in RDL and GluCl receptors of insects and are indicated with purple asterisks in **Fig. 2A**. This included Q267, I270, L274, A295, D325,

G329, F332 and V333 for Phh-RDL. and Q241, I244, M248, S279, D309, G313, L316 and T317 for Phh-GluCl.

A distance tree analysis of *P. humanus humanus* GluCl and RDL sequences including *D. melanogaster*, the honey bee *Apis mellifera*, the house fly *Musca domestica*, *R. microplus* and the red flour beetle *Tribolium castaneum* confirmed the orthologous relationships of the louse subunit sequences with their respective counterparts (**Fig. 2B**). GluCl amino acid sequences revealed that Phh-GluCls were found to be highly conserved, sharing 78%, 84%, 81% and 70% identities with the respective orthologues from *A. mellifera*, *T. castaneum*, *D. melanogaster* and *R. microplus*. Phh-RDL-1 and 2 shared 84%, 81%, 67% and 54% identities with their orthologues from *A. mellifera*, *T. castaneum*, *D. melanogaster* and *R. microplus*, respectively. These observations are in accordance with the relative position of Phthiraptera and Hymenoptera insect subfamilies and Acarids [51] and were further confirmed by supplementary analysis including other members from the GABA and GluCl groups from additional arthropod species (**S1 Fig.** and **S2 Fig.**). In the phylogeny of GABA subunits, Phh-RDL-1/-2 were found to clearly cluster distinctly from the LCCH3, GRD and 8916 subunits, showing that each species has inherited an ancestral gene. Altogether, the phylogenetic observations support that we cloned the *P. humanus humanus* GluCl and RDL subunit orthologues allowing their subsequent assessment at the functional level.

***P. humanus humanus* GluCl and RDL subunits form functional homomeric channels in *Xenopus* oocytes**

In previous studies, arthropod GluCl and RDL subunits were shown to reconstitute functional channels when expressed in *Xenopus* oocytes [32]. Hence, we hypothesized that the ortholog subunits from *P. humanus humanus* could form functional receptors. Following the cloning of two full-length coding sequences for Phh-GluCl and Phh-RDL subunits, their respective cRNAs were microinjected in *X. laevis* oocytes. To investigate the receptor functionality, responses to agonists were assessed by two-electrode voltage-clamp (TEVC) electrophysiology. In sharp contrast with Phh-GluCl-1 and Phh-RDL-1 subunits (**Fig. 3**), injections of *Phh-GluCl-2* (n=11) and *Phh-RDL-2* (n=12) cRNAs never led to recordings of glutamate- and GABA-evoked currents, respectively, indicating that these subunits did not form functional receptors (**S3 Fig.**). Thus, Phh-GluCl-1 and Phh-RDL-1 will be henceforth referred to as Phh-GluCl and Phh-RDL in the article. When glutamate was perfused in the recording chamber, we could record fast inward currents in the μ A range in oocytes injected with *Phh-GluCl* (**Fig. 3A**). As expected, this receptor desensitized extremely rapidly upon prolonged glutamate exposure. Then, we obtained the concentration-response curve by challenging the oocytes with glutamate concentrations ranging from 1 to 1000 μ M. With current amplitudes normalized to the maximal response to 1000 μ M, we found that the glutamate EC₅₀ value of Phh-GluCl was 9.3 $\pm$ 1.3 μ M with a Hill coefficient of 1.9 $\pm$ 0.5 (n=5) suggesting the presence of more than one glutamate binding site (**Fig. 3A-B**). When *Phh-RDL* cRNAs were injected in oocytes, the application of 100 μ M GABA resulted in robust currents with maximum amplitudes in the μ A range (**Fig. 3C**). The GABA concentration-response curve was characterized by an EC₅₀ of 16.0 $\pm$ 0.4 μ M (n=6) with a Hill coefficient of 2.3 $\pm$ 0.1 (n=6) suggesting the binding of more than two GABA molecules (**Fig. 4C-D**). As previously shown in the literature, RDL and GluCls are permeable to chloride anions [35, 37, 52-55]. Here, the TM2 amino acid sequences of Phh-RDL and Phh-GluCl are respectively 100% identical with RDL and GluCls from other insect species such as *A. mellifera*, *D. melanogaster*, *T. castaneum* (**Fig. 2A**), suggesting they are anionic receptors. In order to investigate the ion selectivity, we applied voltage-ramps to oocytes expressing Phh-GluCl or Phh-RDL and measured the reversal potentials for the respective glutamate and GABA-sensitive currents in recording solution with varying concentrations of either chloride or sodium. Then, the

reversal potentials were plotted against the chloride or sodium concentration (**Fig. 3C-F**). In the standard recording solution containing 100 mM NaCl, glutamate-induced currents reversed at -23.39 ± 1.26 (n=12) (**Fig. 3C**). When the extracellular chloride concentration decreased from 104.5 to 4 mM (replacement of chloride by sodium acetate), Phh-GluCl exhibited a 13.4 ± 2.3 mV shift upon a 10-fold change in the chloride concentration (n=7). In contrast, decreasing the extracellular sodium concentration from 100 to 0 mM (replaced by tetraethylammonium chloride) did not significantly shift the reversal potential (1.0 ± 0.5 mV shift per decade, n=7). Similarly, ion selectivity of Phh-RDL were also investigate. Phh-RDL were highly sensitive to a extracellular chloride concentration change (36.4 ± 1.2 mV shift upon a 10-fold change in the chloride concentration, n=4) whereas it was almost insensitive to sodium extracellular change (2.3 ± 0.8 mV shift per decade, n=4) (**Fig. 3F**). These results indicate that both Phh-GluCl and Phh-RDL form chloride permeable glutamate and GABA-gated channels that do not permeate sodium ions, consistently with the pore selectivity filter sequence (**Fig. 2A**) and channels from other species [55, 56]. In summary, these findings demonstrate that two novel functional homomeric receptors from the human body louse, Phh-GluCl and Phh-RDL, with respectively high affinity to glutamate or GABA were reconstituted in *Xenopus* oocytes.

Differential effects of ivermectin and lotilaner on *P. humanus humanus* GluCl and RDL channels

Arthropod GluCl and RDL channels are well-known targets for insecticides [32]. In order to investigate their respective insecticides sensitivities, Phh-GluCl and Phh-RDL were challenged with ivermectin, lotilaner, fipronil and picrotoxin. Recordings from oocytes expressing Phh-GluCl revealed that ivermectin is a potent agonist of this receptor. A slow activation of the receptor was observed with application of ivermectin as low as 10 nM and large μ A currents were recorded in response to 1 μ M ivermectin with an average of $86.5 \pm 8.2\%$ (n=6) of the 1 mM glutamate-elicited current (**Fig. 4A**). As expected, the effect of ivermectin was not reversible. The dose response curve (**Fig. 4B**) revealed an ivermectin EC_{50} of 78.52 ± 30.22 nM (n=3-9). When applied on Phh-GluCl expressing oocytes, lotilaner at 1-30 μ M (**Fig. 4C**) did not elicit any current and mediated no significative ($p > 0.057$) inhibitory effect on glutamate-evoked currents (**Fig. 4D**). We subsequently tested the activity of selected insecticides on the Phh-RDL channel. As anticipated from the literature, lotilaner, picrotoxin and fipronil had no agonist effect (**Fig. 5**). However, 90 s application of ivermectin at 0.3-30 μ M elicited a slow and sustained current on Phh-RDL which was not reversible (**Fig S4A**). First agonist effect was observed with 300 nM ivermectin and the maximum effet corresponding to $7.9 \pm 1.3 \%$ (n=6) of the 1 mM glutamate response was reached with 1 μ M ivermectin (**Fig. S4B**). Then, we investigated the potential antagonistic effects of the selected insecticides on GABA recording traces. Oocytes expressing Phh-RDL were preincubated with the drug for 90 s followed by coapplication with 100 μ M GABA. **Figures 5A-D** illustrate results from application of 100 μ M GABA before, during and after the sequential addition of an increasing concentration of insecticides. For fipronil, ivermectin and lotilaner, GABA elicited current was almost completely inhibited with drugs at 3 μ M. On the other hand, picrotoxin showed a weaker effect on Phh-RDL since the full inhibition of the GABA elicited current was observed with 30 μ M picrotoxin. In accordance with the litterature [57], ivermectin acted as a weak inhibitor of Phh-RDL (IC_{50} of 342 nM) compared to its agonist effect on Phh-GluCl (EC_{50} of 78 nM). More importantly, GABA responses were completely and irreversibly blocked with lotilaner as low as 300 nM suggesting that Phh-RDL is more sensitive to lotilaner than to the insecticides fipronil or picrotoxin (**Fig. 5E**). To characterize this effect, antagonist concentration-response relationships were performed (**Fig. 5E**). 0.5 ± 0.3 μ M (n = 6 oocytes). Concentration-response curves were characterized with IC_{50} of 137.5 ± 35.1 nM (n=6) for fipronil, 1.16 ± 0.23 μ M for picrotoxin (n=6), 342.5 ± 14.0 nM (n=6) and for ivermectin. Lotilaner resulted in the most potent dose-dependent

inhibition of the GABA-mediated currents with an IC_{50} value of 40.7 ± 6.8 nM ($n=6$) (**Fig. 5E**). Rank order potency series for each of the Phh-RDL antagonists tested was as follows: lotilaner > fipronil $\approx$ ivermectin > picrotoxin. Ivermectin acted as a weak inhibitor of Phh-RDL (IC_{50} of 342 nM) compared to its agonist effect on Phh-GluCl (EC_{50} of 78 nM).

In order to determine the type of inhibition caused by lotilaner and ivermectin on Phh-RDL, we performed a competitive experiment. Briefly, a fixed concentration of lotilaner (1 nM and 10 nM) or ivermectin (100 nM) was continuously perfused and an increasing concentration of GABA was applied on oocytes. Each GABA response was normalized to the response induced by 100 μ M GABA alone performed prior to challenging the oocytes with lotilaner or ivermectin. The EC_{50} and maximum current amplitude were 16.0 ± 0.4 μ M and 97.95 ± 0.69 % ($n=6$) for GABA alone, 14.3 ± 1.9 μ M and 69.16 ± 2.54 % ($n=5$) in presence of 1 nM lotilaner and 11.5 ± 4.0 μ M and 48.56 ± 4.90 % ($n=6$) in presence of 10 nM lotilaner (**Fig. 6A**). The presence of lotilaner didn't change the GABA EC_{50} ($p > 0.49$ and $p > 0.32$ for 1 nM and 10 nM respectively) but reduced significantly the maximum current amplitudes reached with a saturated GABA concentration ($p < 0.0001$ for both 1 nM and 10 nM) characteristic of non-competitive antagonism. The competition experiment with ivermectin showed the remarkable ivermectin mode of action on Phh-RDL. Indeed, coapplication of low ivermectin concentration (100 nM) and low GABA concentration (3 μ M) increased the current amplitude compared to the application of GABA alone highlighting the potentialising effect of ivermectin (**Fig. 6B**). On the other hand, higher concentration of ivermectin (>1 μ M) have a dual mode of action with a weak current activation (**Fig. S4**) and an inhibition of the GABA elicited current highlighting both the agonism and antagonism effect of ivermectin (**Fig. 6B**).

Altogether, these results demonstrate that *P. humanus humanus* GluCl and RDL characterized in *Xenopus* oocytes display original pharmacologies regarding insecticides. Ivermectin acted as a strong agonist of Phh-GluCl whereas it had a double action on Phh-RDL with antagonist and agonist effect depending on the concentration, while the anti-ticks and fleas lotilaner was a potent and selective non-competitive antagonism of RDL of human lice.

Discussion

First functional characterization of LGICs from human lice

In the present study, we report the first functional expression and pharmacological characterization of any human louse LGICs. Indeed, despite the social and public health impacts of human lice and the growing issue of resistance to pediculicides and since the complete sequencing of the body louse genomes, there was to our knowledge no functional characterization of any LGICs from lice so far [10, 29]. Because glutamate and GABA are important neurotransmitters in the insect central nervous system and their receptors are targets for insecticides, we focused our attention on glutamate- and GABA-sensitive receptors. GluCl and RDL channel subtypes of LGICs have been extensively characterized in many arthropod species starting with the model fruit fly *D. melanogaster* and ranging from agricultural and sanitary pests to animal ectoparasites and disease vectors but also beneficial insects like the honey bee [32, 33]. Here, we show that *P. humanus humanus* GluCl and RDL subunits gave rise to homomeric channels when functionally expressed in *Xenopus* oocytes. This experimental expression system provided a unique means to assess the pharmacological and biophysical properties of these receptors. Even though two putative genes encoding respectively a GluCl and a GABA receptor have been identified in the genomic database, the molecular cloning of complete cDNAs revealed at least two potential full-length transcripts for both candidates (i.e. Phh-GluCl-

1, Phh-GluCl-2 and Phh-RDL-1, Phh-RDL-2). These transcripts could either be alternative spliced isoforms or result from RNA A-to-I editing, a mechanism of RNA edition described in lice [58]. In insects, alternative splicing and RNA A-to-I editing are known to increased diversity of LGICs subunits [59-62]. Undoubtedly, further molecular investigations at the DNA level would be required to confirm this hypothesis. Here, we report that both Phh-GluCl-1 and Phh-RDL-1 can be robustly expressed in *Xenopus* oocytes, whereas neither Phh-GluCl-2 nor Phh-RDL-2 subunits formed functional receptors in our conditions. Interestingly, Phh-GluCl had one of the highest affinity for glutamate compared to other GluCls of arthropod species, the reported EC₅₀ of which varied between 6.89 in *Caligus rogercresseyi* and 3.019 mM in *Tetranychus cinnabarinus* [35, 43, 52-54, 57, 63-66]. Likewise, Phh-RDL had one of the lowest EC₅₀ for GABA among described insect RDL receptors showing EC₅₀ varying between 5.43 +/- 0.02 μ M in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* [67] and 445 +/- 47 μ M in the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* [57] with the exception of the RDL-2 subunit (2.4 +/- 0.3 μ M) from the honey bee parasite mite *Varroa destructor* [55]. Similarly, spliced variant transcripts of GluCl and RDL subunits were found to give rise to functional channels in several insect species, thus increasing their receptor diversity [33, 61, 62, 65, 66, 68-70]. Here, we identified and characterized the first GluCl and GABA_A receptors of human lice. This study opens the way for the characterization of other receptor subtypes which can also be relevant target.

New insights into the mode of action of ivermectin on lice

Despite the massive use of pediculicidal compounds during the past decades, there was to our knowledge no functional characterization of their molecular targets in lice. Macrocyclic lactones are widely used in both veterinary and human medicine, with ivermectin being typically the recommended molecule for the control of body lice [27-29]. This broad-spectrum drug is highly efficient against a wide range of pathogens including endo and ectoparasites such as nematodes, acarians and insects [26]. In comparison with other pediculicides, ivermectin presents some major advantages. First, it has long been recognized that it is a safe pharmaceutical in human health due to low level of toxicity for mammals, in sharp contrast with classical pediculicides [71]. Indeed, former drugs such as fipronil, lindane or malathion are now forbidden for human use in several countries because of their toxicity and environmental impact [20-25]. Second, ivermectin is currently the only molecule used as an oral treatment against lice. For head lice, oral route avoids suboptimal shampoo application, thus reducing the emergence and transmission of resistant lice [28, 72-74]. For body lice, oral dosing is of particular interest to treat people having a limited access to basic hygiene services. However, despite these remarkable advantages, ivermectin's efficacy is currently compromised by the emergence of resistant lice [30, 31].

Here, our bioassay confirmed the pediculicidal activity of ivermectin on human body lice. Furthermore, we addressed for the first time the mode of action of ivermectin at the molecular level on glutamate- and GABA-gated receptors. We showed that ivermectin activated preferentially Phh-GluCl channel but can also activated in a much lower extend the GABA receptor Phh-RDL. In addition, ivermectin blocked the RDL receptor but with an IC₅₀ 4 times higher than the EC₅₀ required to activate Phh-GluCl. These findings suggest that Phh-GluCl is ivermectin preferential target. Interestingly, functional silencing using RNAi has already been shown to be an efficient and promising approach to investigate the role of detoxification genes in ivermectin tolerance of human body lice [75]. In order to confirm that GluCl is the main target of ivermectin in lice, it would be interesting to explore *in vivo* the phenotype of *Phh-GluCl* siRNA silenced lice as previously demonstrated for abamectin in *T. cinnabarinus* and in the crop whitefly pest *Bemisia tabaci* [57, 76]. Finally, following the recent observation of GluCl single-nucleotide-polymorphisms (SNPs) in

phenotypically ivermectin-resistant head lice [30], our results provide a unique means to explore the molecular mechanisms underlying louse resistance to ivermectin. In a further step, such electrophysiology studies in *Xenopus* oocytes will enable to determine the functional relevance of GluCl SNPs detected in ivermectin-resistant lice [53, 64, 77-79]. Although the putative role of those SNPs are to be determined, we can reasonably assume that mutated subunits can lead to GluCl altered functionality, probably resulting in ivermectin resistance. Additionally, screening on ivermectin-resistant GluCl recombinantly expressed will provide a powerful tool to optimize the design of new pediculicidal compounds. Further investigations are required to understand the mechanisms of ivermectin resistance and to define new control strategies to avoid emergence of resistance as well as preserve this molecule efficacy.

On the mode of action of isoxazolines in arthropods

With the recent introduction of new generation of compounds in the isoxazoline class (e.g. lotilaner), the development of detailed understanding of the actions of isoxazolines is essential. Arthropod RDL channels are major targets for several insecticidal classes including dieldrin itself and fipronil [32] and they were recently shown to be the primary target for isoxazolines [39-43]. Therefore, we hypothesized that they could act on RDL from *Pediculus humanus humanus*. Also, based on the molecular docking of fluralaner on GABAR *Musca domestica* [50], the amino acid involved in the binding pocket are perfectly conserved with Phh-RDL. In addition, fluralaner preferentially targets *M. domestica* GABA receptor (IC₅₀ of 6.05 +/- 1.47 nM) but also shown an activity on GluCl but with higher IC₅₀ (146 +/- 14 nM) suggesting a possible effect of lotilaner on the both lice receptors. However, the pharmacological characterization of Phh-RDL and Phh-GluCl show that the inhibitory effects of lotilaner depend on the receptor subtype. Indeed, lotilaner efficiently and selectively blocked the GABA response on Phh-RDL whereas Phh-GluCl was not affected even using high concentration (30 μM) representing 737 fold the lotilaner IC₅₀ for Phh-RDL. In order to confirm these findings, it will be interesting to silence the *rdl* gene using RNAi in human body lice [57]. Our results clearly demonstrated the selective antagonistic action of lotilaner on RDL over GluCl channels contrary to fluralaner, which was reported to inhibit both RDL and GluCl from *M. domestica* and *R. microplus* [39, 43, 49]. Whether these differences might be due to the compounds themselves or the pharmacological properties of receptors from different species remain to be investigated. Furthermore, the amino acids implicated in the binding of lotilaner are not known yet although some studies recently suggested that amino acids in the TM1 and TM3 might be critical in RDL from *M. domestica* [80]. The mechanism of action of lotilaner on RDL receptors at the molecular level are still to be deciphered. Likewise, further efforts are needed to better understand the molecular basis of the insect selectivity of isoxazolines over vertebrate channels. Contrary to homomeric arthropod RDL channels, the vertebrate GABA are heteromeric channels made of different subunits. Recent studies indicated that fluralaner and lotilaner were highly selective of arthropod RDL channels while poorly efficient on rat brain membranes (IC₅₀ > 10 μM), rat GABA channels (IC₅₀ > 30 μM) and canine GABA (IC₅₀ > 10 μM), respectively, thus evidencing for low mammalian toxicity [39, 42, 43]. Resistance to isoxazolines has not been reported so far and fipronil resistance is likely not to confer cross-resistance to isoxazolines. Indeed, RDL receptor from *D. melanogaster* and *M. domestica* with known mutation conferring fipronil and dieldrin resistance didn't affect the antagonism effect of fluralaner and lotilaner respectively [42, 43]. The lack of cross-resistance was confirmed *in vivo* for the houseflies [42, 43]. Likewise, the distinct mechanisms of action for ivermectin and lotilaner seem to indicate that resistance to ivermectin will not extend to lotilaner or the other isoxazolines. Identification of homologous genes encoding RDL subunits and investigation of new expressed recombinant RDL from many other arthropod species including important insect pest species, acari and crustaceans

will enhance our understanding of the action of isoxazolines. The potency and selectivity of isoxazolines indicate an important future for this class of compounds.

From dog to human: the future for isoxazoline insecticides as promising pediculicidal candidates

The isoxazoline class includes a new generation of insecticidal compounds recently introduced for insect chemical control but also other ectoparasites such as acari and other arthropods [45]. Since the discovery of isoxazolines, their insecticidal spectrum has become broader to agricultural, sanitary and animal insect pests belonging to eleven orders missing out the order of *Phthiraptera* [39-43, 46]. In the present study, we hypothesized that the isoxazolines could represent attractive candidate drugs to extend the pharmacopeia for louse control. Among the different compounds from the isoxazoline family, we selected the insecticide lotilaner as a model for concept proof of isoxazoline effectiveness as pediculicidal for human use. Isoxazolines are licensed for protection of companion animals against fleas and ticks and therefore presents a reduced toxicity to mammals; second, it has a long lasting effect after a single oral administration [42, 81]. In dogs, lotilaner remains active against ticks and fleas during one month with an efficacy ranging from 98 to 100% [82, 83]. Here, we assessed the pediculicidal potential of lotilaner against different stages of body lice. Strikingly, our bioassays on human body lice demonstrated that the adulticide effect of lotilaner was higher than that of ivermectin and fipronil. Whereas 10 μ M ivermectin treatment killed 100% of adult lice after 24h, we obtained the same result with 10 μ M lotilaner in only 3 hours following exposure. This fast activity is in accordance with the 4h-12h needed to kill ticks and fleas in lotilaner treated dogs [82, 83]. In contrast, neither ivermectin nor lotilaner were found to have a pediculicidal activity on nits. Based on dog data, we can speculate that a single oral dose could provide a pediculicidal activity above 17 days corresponding to the complete life cycle of the human lice [9, 19]. Therefore, the long lasting activity of lotilaner could overcome the absence of activity on embryonated eggs and also prevent re-infestations with a single oral dose. Considering its relatively benign toxicological profile for mammals along with rapid knockdown of lice, lotilaner seems to be an excellent candidate drug to tackle louse infestations in humans. Nevertheless, the innocuity of lotilaner towards human remains to be proven as well as its pharmacokinetics. Interestingly, Miglianico *et al.* recently reported the high efficacy of two other veterinarian drugs from the isoxazoline family (i.e afoxolaner and fluralaner) against a panel of insect species representing major vectors for human tropical diseases [84]. The potential of the isoxazolines to control ectoparasites with animal and human health importance has been discussed by Weber & Selzer, 2016 [45]. Computational modelling highlighted both the feasibility and the relevancy of using isoxazoline for human medication. In accordance, our results strongly support isoxazoline compounds as major candidates for drug repurposing alone or in co-administration with ivermectin. Indeed, new combinations of active compounds have become frequent in veterinary medicine (e.g. anthelmintics). Alike ivermectin, a useful feature of lotilaner is its mode of administration through oral route, which is more tractable to human than topical formulations. Since ivermectin and lotilaner are efficient at targeting distinct receptors,

it is tempting to suggest that a combination of both drugs may have a considerable potential, resulting in an additive or a synergistic effect allowing the control of emerging ivermectin resistant lice and delay or overcome resistance. Such a therapeutic option was recently achieved with the release of fluralaner combined with moxidectin [85, 86] and sarolaner combined with selamectin on the veterinary market for small animals [87, 88]. Hence, it is reasonable to conclude that further investigations on the efficacy of lotilaner alone or in combination with ivermectin for general use as pediculicides would be particularly pertinent and justified. We hope that the results presented here contributes to an increased understanding on the mechanisms behind the physiology of neurotransmission and of the mode of action of the pediculicidal drugs in body lice at the functional level and will provide new therapeutic strategies to ensure the sustainable and effective control of louse infestations.

Methods

Chemical assays on body lice

The colony of human body lice (*Pediculus humanus humanus*) were provided by Kosta Y. Mumcuoglu from the Kuvim Center for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel. This laboratory-reared colony adapted to rabbit blood were fed four times per week (permit number of the French Ministry for Research: APAFIS#8455-2017010616224913 v3) and maintained at 30 ± 1 °C and 60-70% relative humidity without exposure to any drugs [89]. Survival and immobilization (knockdown) were monitored at 1, 2, 3 and 24 h after contact of 44 lice with insecticides at concentrations ranging from 1 to 100 μ M or 1% DMSO. Nits (50 to 190 per condition) were incubated with lotilaner or ivermectin and hatching was monitored between six and nine days. Water and solution of 1 % DMSO were used as negative controls. Pictures and movies were recorded with a Motic Digital Microscope 143 Series and the Motic Image Plus 3.0 software. Movies were cut out with Apple inc. iMovie 10.1.6.

Cloning of full-length cDNA sequences of *GluCl* and *rdl* from *Pediculus humanus humanus*

Total RNA was extracted from 30 mg of lice (15 lice) using the Total RNA isolation Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's recommendations. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the GeneRacer kit with the SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Using the *A. mellifera* and *D. melanogaster* *GluCl* and *RDL* subunit sequences as queries, tBLASTn searches in NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) allowed the identification of partial genomic contigs (AAZO01006897 and AAZO01005501 for *Phh-GluCl* and AAZO01005738, AAZO01000267 and AAZO01000266 for *Phh-rdl*) and partial mRNA sequences (XM_002429761 for *Phh-GluCl* and XM_002422861.1 for *Phh-rdl*) containing the 3' cDNA ends. Primers designed on the sequences retrieved from the BLAST searches are reported in **S1 Table**. Then, the corresponding 5' cDNA ends were obtained by RLM-RACE experiments using the Generacer kit with two rounds of PCR as described elsewhere [90]. After the identification of the cDNA 5' ends, new primers were designed. The full-length complete coding sequences of *Phh-GluCl* and *Phh-rdl* were subsequently amplified by nested PCRs with the proofreading Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) using two pairs of primers. Then, PCR products were cloned into the transcription vector pTB-207 [91] using the In-Fusion HD Cloning kit (Clontech) as described previously [92]. Recombinant plasmid DNA was purified using EZNA Plasmid DNA Mini kit (Omega Bio-Tek) and the sequences were checked (Eurofins Genomics). The novel complete coding

sequences of the two Phh-GluCl and Phh-RDL subunits were deposited to Genbank under the accession numbers MT321070 to MT321073. The constructions were linearized with the Mlsl restriction enzyme (ThermoFisher) and cRNAs were synthesized *in vitro* using the mMessage mMachine T7 transcription kit following the manufacturer's recommendations (Ambion). Lithium chloride-precipitated cRNAs were resuspended in RNase-free water and stored at -20 °C.

Sequence analysis and phylogeny

Signal peptide and transmembrane domain were predicted using SignalP4.1 [93] and SMART [94], respectively. Deduced amino-acid sequences of Phh-GluCl and Phh-RDL were aligned using the MUSCLE algorithm [95] and further processed with GeneDoc (IUBio). The phylogenetic distance trees were generated on amino-acid sequences by the SeaView software [96] using BioNJ Poisson parameters and bootstrap values were calculated with 1000 replicates as described previously [97]. The resulting trees were modified by FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The accession numbers for the protein sequences mentioned in this article are: *Apis mellifera* (Ame): GluCl ABG75737, GRD AJE68942, LCCH3 AJE68943, RDL AJE68941, CG8916 NP_001071290; nAChR7 AJE70265; *Ctenocephalides felis* (Cfe): RDL AHE41088; *Drosophila melanogaster* (Dme): GluCl AAC47266, GRD NP_524131, LCCH3 NP_996469, RDL NP_523991, CG8916 NP_001162770; *Ixodes scapularis* (Isc): GluCl ALF36853; *Musca domestica* (Mdo): GluCl BAD16657, RDL NP_001292048; *Pediculus humanus humanus* (Phh): GluCl1 MT321070, GluCl2 MT321071, RDL1 MT321072, RDL2 MT321073; *Rhipicephalus microplus* (Rmi): GluCl AHE41097, RDL AHE41094; *Tetranychus urticae* (Tur): GluCl BAJ41378 and *Tribolium castaneum* (Tca): GluCl NP_001107775, GRD NP_001107772, LCCH3 NP_001103251, RDL NP_001107809, 8916 NP_001103425.

Electrophysiology in *Xenopus laevis* oocytes and data analysis

Defolliculated *Xenopus laevis* oocytes were purchased from Ecocyte Bioscience and maintained in incubation solution (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂·2H₂O, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mM HEPES, 2.5 mM C₃H₃NaO₃, pH 7.5 supplemented with penicillin 100 U/mL and streptomycin 100 µg/mL) at 19 °C. Each oocyte was microinjected with 57 ng of cRNA encoding Phh-GluCl or Phh-RDL using a Drummond nanoject II microinjector. Three to five days after cRNA injection, two-electrode voltage-clamp recordings were performed with an oocyte clamp OC-725C amplifier (Warner instrument) at a holding potential of -80mV or -60 mV to assess the expression of the GluCl or RDL channels. Currents were recorded and analyzed using the pCLAMP 10.4 package (Molecular Devices). Concentration-response relationships for agonists were carried out by challenging oocytes with 10 s applications of increasing concentrations of compounds. The peak current values were normalized to the response to 1000 µM glutamate or 100 µM GABA giving the maximum current amplitude for GluCl and RDL channels, respectively. For Phh-GluCl, the dose response relationship for ivermectin were performed by applying a concentration of ivermectin for 20 – 30 s. Each oocyte received only one low ivermectin concentration (≤ 30 nM) followed with a high ivermectin concentration (≥ 100 nM). Data were normalized to a first 100 µM glutamate application. For RDL, the effect of antagonists was evaluated, by a first preincubation of each antagonist alone for 90 s, followed by the co-application with 100 µM GABA for 10 s. Oocytes were then washed with recording buffer and sequentially preincubated with an increasing antagonist concentration followed by coapplication with 100 µM GABA. The observed responses were normalized to the response induced by 100 µM GABA alone performed prior to challenging with the antagonist. The concentration of agonist required to mediate 50% of the maximum response (EC₅₀) and the concentration of antagonist required to inhibit 50% of the agonist response (IC₅₀) and the Hill coefficient (nH) were determined using

non-linear regression on normalized data with GraphPad Prism software. Concentration response curves for agonists were fitted with the following equation :

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{H(\log EC_{50} - X)}}$$

Where Y is the normalized response, H is the Hill slope and X is the logarithm of concentration. The same equation was used for the concentration response curves for antagonists by replacing logEC₅₀ by logIC₅₀.

Results are shown as mean +/- SEM and statistical analysis were performed using One-Way ANOVA with Tukey's Multiple Comparisons Test.

The competitive experiments on Phh-RDL were performed as previously described [42] with a concentration response relationship in the presence of GABA alone or with 1 nM and 10 nM lotilaner. A pre-application of 1 nM and 10 nM lotilaner for 90 s was followed by a coapplication of an increasing concentration of GABA (1 – 1000 µM) for 10 s with a 30 s wash between each concentration. Current amplitudes were normalized with a first 100 µM GABA application. The corresponding concentration response curves (**Fig. 6**) were fitted using the following four parameter Hill equation :

$$Y = \frac{\text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{H(\log EC_{50} - X)}}$$

Where Bottom is the response at the minimal concentration and Top is the maximal response. Statistical comparison were performed using unpaired Student's t test.

Chloride and sodium permeabilities were conducted as described previously [55]. In brief, the reversal potential of the GABA-induced currents was measured with a 1500-ms-long ramp of voltage from -60 to +60 mV in standard saline recording solution (100 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.3) as well as in recording solutions containing a concentration range of either chloride (NaCl replaced by sodium acetate) or sodium (NaCl replaced by tetraethylammonium chloride).

Materials

Glutamate, GABA, fipronil, picrotoxin and ivermectin were purchased from Sigma-Aldrich. Glutamate and GABA were directly dissolved in recording solution. Fipronil, picrotoxin and ivermectin were first dissolved at 10-100 mM in DMSO and then diluted in recording solution to the final concentrations in which DMSO did not exceed 1 %. Lotilaner (Credelio™, Elanco, USA) was a commercial formulation purchased in a local pharmacy store. Tablets containing 450 mg lotilaner were dissolved in DMSO to obtain a 100 mM lotilaner stock solution and subsequently diluted in recording solution at a final DMSO concentration less than 0.003%.

Acknowledgments

We acknowledge the gift of the human body louse colony from Kosta Y. Mumcuoglu from the Department of Microbiology and Molecular Genetics, Kuvin Center for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel. This study was supported by the Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) and the Université de Tours (annual

endowment) and in part by the RTR Fédération de Recherche en Infectiologie (FéRI) of the Région Centre-Val de Loire to CN, CD and IDP. NL is the grateful recipient of a PhD grant from the Animal Health Division of INRAE and from the Région Centre-Val de Loire, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Boutellis A, Abi-Rached L, Raoult D. The origin and distribution of human lice in the world. *Infect Genet Evol.* 2014;23:209-17. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.017. PubMed PMID: 24524985.
2. Falagas ME, Matthaïou DK, Rafailidis PI, Panos G, Pappas G. Worldwide prevalence of head lice. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(9):1493-4. doi: 10.3201/eid1409.080368. PubMed PMID: 18760032; PubMed Central PMCID: PMC2603110.
3. Al-Shahrani SA, Alajmi RA, Ayaad TH, Al-Shahrani MA, Shaurub EH. Genetic diversity of the human head lice, *Pediculus humanus capitis*, among primary school girls in Saudi Arabia, with reference to their prevalence. *Parasitol Res.* 2017;116(10):2637-43. doi: 10.1007/s00436-017-5570-3. PubMed PMID: 28803388.
4. Badiaga S, Brouqui P. Human louse-transmitted infectious diseases. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(4):332-7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03778.x. PubMed PMID: 22360386.
5. Liao CW, Cheng PC, Chuang TW, Chiu KC, Chiang IC, Kuo JH, et al. Prevalence of *Pediculus capitis* in schoolchildren in Battambang, Cambodia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019;52(4):585-91. doi: 10.1016/j.jmii.2017.09.003. PubMed PMID: 29150362.
6. Louni M, Mana N, Bitam I, Dahmani M, Parola P, Fenollar F, et al. Body lice of homeless people reveal the presence of several emerging bacterial pathogens in northern Algeria. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(4):e0006397. doi: 10.1371/journal.pntd.0006397. PubMed PMID: 29664950; PubMed Central PMCID: PMC5922582.
7. Ly TDA, Toure Y, Calloix C, Badiaga S, Raoult D, Tissot-Dupont H, et al. Changing Demographics and Prevalence of Body Lice among Homeless Persons, Marseille, France. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(11):1894-7. doi: 10.3201/eid2311.170516. PubMed PMID: 29048280; PubMed Central PMCID: PMC5652409.
8. Nejati J, Keyhani A, Tavakoli Kareshk A, Mahmoudvand H, Saghaipour A, Khoraminasab M, et al. Prevalence and Risk Factors of Pediculosis in Primary School Children in South West of Iran. *Iran J Public Health.* 2018;47(12):1923-9. PubMed PMID: 30788308; PubMed Central PMCID: PMC6379608.
9. Veracx A, Raoult D. Biology and genetics of human head and body lice. *Trends Parasitol.* 2012;28(12):563-71. doi: 10.1016/j.pt.2012.09.003. PubMed PMID: 23069652.
10. Kirkness EF, Haas BJ, Sun W, Braig HR, Perotti MA, Clark JM, et al. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(27):12168-73. doi: 10.1073/pnas.1003379107. PubMed PMID: 20566863; PubMed Central PMCID: PMC2901460.
11. Olds BP, Coates BS, Steele LD, Sun W, Agunbiade TA, Yoon KS, et al. Comparison of the transcriptional profiles of head and body lice. *Insect Mol Biol.* 2012;21(2):257-68. doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01132.x. PubMed PMID: 22404397.
12. Combescot-Lang C, Vander Stichele RH, Toubate B, Veirron E, Mumcuoglu KY. Ex vivo effectiveness of French over-the-counter products against head lice (*Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778). *Parasitol Res.* 2015;114(5):1779-92. doi: 10.1007/s00436-015-4363-9. PubMed PMID: 25716822.
13. Izri A, Uzzan B, Maigret M, Gordon MS, Bouges-Michel C. Clinical efficacy and safety in head lice infection by *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) of a capillary spray containing a silicon-oil complex. *Parasite.* 2010;17(4):329-35. doi: 10.1051/parasite/2010174329. PubMed PMID: 21275239.
14. Diamantis SA, Morrell DS, Burkhart CN. Treatment of head lice. *Dermatol Ther.* 2009;22(4):273-8. doi: 10.1111/j.1529-8019.2009.01242.x. PubMed PMID: 19580574.
15. Frankowski BL. American Academy of Pediatrics guidelines for the prevention and treatment of head lice infestation. *Am J Manag Care.* 2004;10(9 Suppl):S269-72. PubMed PMID: 15515631.
16. Clark JM, Yoon KS, Lee SH, Pittendrigh BR. Human lice: Past, present and future control. *Pestic Biochem Phys.* 2013;106(3):162-71. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.03.008. PubMed PMID: WOS:000321805100013.
17. Downs AM, Stafford KA, Harvey I, Coles GC. Evidence for double resistance to permethrin and malathion in head lice. *Br J Dermatol.* 1999;141(3):508-11. doi: 10.1046/j.1365-2133.1999.03046.x. PubMed PMID: 10583056.
18. Durand R, Bouvresse S, Berdjane Z, Izri A, Chosidow O, Clark JM. Insecticide resistance in head lice: clinical, parasitological and genetic aspects. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(4):338-44. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03806.x. PubMed PMID: 22429458.
19. Lebwohl M, Clark L, Levitt J. Therapy for Head Lice Based on Life Cycle, Resistance, and Safety Considerations. *PEDIATRICS.* 2007;119(5):965-74. doi: 10.1542/peds.2006-3087.

20. Idriss S, Levitt J. Malathion for head lice and scabies: treatment and safety considerations. *J Drugs Dermatol.* 2009;8(8):715-20. PubMed PMID: 19663108.
21. Eisenhower C, Farrington EA. Advancements in the treatment of head lice in pediatrics. *J Pediatr Health Care.* 2012;26(6):451-61; quiz 62-4. doi: 10.1016/j.pedhc.2012.05.004. PubMed PMID: 23099312.
22. Nolan K, Kamrath J, Levitt J. Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature. *Pediatr Dermatol.* 2012;29(2):141-6. doi: 10.1111/j.1525-1470.2011.01519.x. PubMed PMID: 21995612.
23. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):490-1. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8. PubMed PMID: 25801782.
24. Richardson JR, Taylor MM, Shalat SL, Guillot TS, 3rd, Caudle WM, Hossain MM, et al. Developmental pesticide exposure reproduces features of attention deficit hyperactivity disorder. *FASEB J.* 2015;29(5):1960-72. doi: 10.1096/fj.14-260901. PubMed PMID: 25630971; PubMed Central PMCID: PMC4415012.
25. Humans IWGoTEoCRt. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon (FR)2017.
26. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin - Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol.* 2017;33(6):463-72. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.004. PubMed PMID: 28285851; PubMed Central PMCID: PMC5446326.
27. Strycharz JP, Yoon KS, Clark JM. A new ivermectin formulation topically kills permethrin-resistant human head lice (Anoplura: Pediculidae). *J Med Entomol.* 2008;45(1):75-81. doi: 10.1603/0022-2585(2008)45[75:anifkt]2.0.co;2. PubMed PMID: 18283945.
28. Sanchezruiz WL, Nuzum DS, Kouzi SA. Oral ivermectin for the treatment of head lice infestation. *Am J Health Syst Pharm.* 2018;75(13):937-43. doi: 10.2146/ajhp170464. PubMed PMID: 29789316.
29. Amanzougaghene N, Fenollar F, Raoult D, Mediannikov O. Where Are We With Human Lice? A Review of the Current State of Knowledge. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:474. doi: 10.3389/fcimb.2019.00474. PubMed PMID: 32039050; PubMed Central PMCID: PMC6990135.
30. Amanzougaghene N, Fenollar F, Diatta G, Sokhna C, Raoult D, Mediannikov O. Mutations in GluCl associated with field ivermectin-resistant head lice from Senegal. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;52(5):593-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.07.005. PubMed PMID: 30055248.
31. Amanzougaghene N, Fenollar F, Nappez C, Ben-Amara A, Decloquement P, Azza S, et al. Complexin in ivermectin resistance in body lice. *PLoS Genet.* 2018;14(8):e1007569. doi: 10.1371/journal.pgen.1007569. PubMed PMID: 30080859; PubMed Central PMCID: PMC6108520.
32. ffrench-Constant RH, Williamson MS, Davies TGE, Bass C. Ion channels as insecticide targets. *Journal of Neurogenetics.* 2016;30(3-4):163-77. doi: 10.1080/01677063.2016.1229781.
33. Wolstenholme AJ. Glutamate-gated chloride channels. *J Biol Chem.* 2012;287(48):40232-8. doi: 10.1074/jbc.R112.406280. PubMed PMID: 23038250; PubMed Central PMCID: PMC3504739.
34. Claxton DP, Gouaux E. Expression and purification of a functional heteromeric GABAA receptor for structural studies. *PLoS One.* 2018;13(7):e0201210. doi: 10.1371/journal.pone.0201210. PubMed PMID: 30028870; PubMed Central PMCID: PMC6054424.
35. Cully DF, Pareiss PS, Liu KK, Schaeffer JM, Arena JP. Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. *J Biol Chem.* 1996;271(33):20187-91. doi: 10.1074/jbc.271.33.20187. PubMed PMID: 8702744.
36. ffrench-Constant RH, Steichen JC, Rocheleau TA, Aronstein K, Roush RT. A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(5):1957-61. doi: 10.1073/pnas.90.5.1957. PubMed PMID: 8095336; PubMed Central PMCID: PMC45999.
37. Ffrench-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC, Chalmers AE. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature.* 1993;363(6428):449-51. doi: 10.1038/363449a0. PubMed PMID: 8389005.
38. Casida JE, Durkin KA. Novel GABA receptor pesticide targets. *Pestic Biochem Physiol.* 2015;121:22-30. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.11.006. PubMed PMID: 26047108.
39. Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod gamma-aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Molec.* 2014;45:111-24. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.11.009. PubMed PMID: WOS:000331856900011.

40. Shoop WL, Hartline EJ, Gould BR, Waddell ME, McDowell RG, Kinney JB, et al. Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs. *Vet Parasitol.* 2014;201(3-4):179-89. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.02.020. PubMed PMID: 24631502.
41. McTier TL, Chubb N, Curtis MP, Hedges L, Inskeep GA, Knauer CS, et al. Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. *Vet Parasitol.* 2016;222:3-11. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.02.019. PubMed PMID: 26961590.
42. Rufener L, Danelli V, Bertrand D, Sager H. The novel isoxazoline ectoparasiticide lotilaner (Credelio (TM)): a non-competitive antagonist specific to invertebrates gamma-aminobutyric acid-gated chloride channels (GABA_{Cl}s). *Parasites & Vectors.* 2017;10. doi: ARTN 530 10.1186/s13071-017-2470-4. PubMed PMID: WOS:000414159300005.
43. Ozoe Y, Asahi M, Ozoe F, Nakahira K, Mita T. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochem Bioph Res Co.* 2010;391(1):744-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.131. PubMed PMID: WOS:000273624500130.
44. Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 2014;45:111-24. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.11.009.
45. Weber T, Selzer PM. Isoxazolines: A Novel Chemotype Highly Effective on Ectoparasites. *ChemMedChem.* 2016;11(3):270-6. doi: 10.1002/cmdc.201500516. PubMed PMID: 26733048.
46. Sheng CW, Jia ZQ, Liu D, Wu HZ, Luo XM, Song PP, et al. Insecticidal spectrum of fluralaner to agricultural and sanitary pests. *J Asia-Pac Entomol.* 2017;20(4):1213-8. doi: 10.1016/j.aspen.2017.08.021. PubMed PMID: WOS:000419749300023.
47. Downs AMR, Stafford KA, Coles GC. Susceptibility of British head lice, *Pediculus capitis*, to imidacloprid and fipronil. *Med Vet Entomol.* 2000;14(1):105-7. doi: DOI 10.1046/j.1365-2915.2000.00216.x. PubMed PMID: WOS:000086260100017.
48. Keramidias A, Moorhouse AJ, Peter PR, Barry PH. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Bio.* 2004;86(2):161-204. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2003.09.002. PubMed PMID: WOS:000223500100001.
49. Nakata Y, Fuse T, Yamato K, Asahi M, Nakahira K, Ozoe F, et al. A Single Amino Acid Substitution in the Third Transmembrane Region Has Opposite Impacts on the Selectivity of the Parasiticides Fluralaner and Ivermectin for Ligand-Gated Chloride Channels. *Molecular Pharmacology.* 2017;92(5):546-55. doi: 10.1124/mol.117.109413.
50. Yamato K, Nakata Y, Takashima M, Ozoe F, Asahi M, Kobayashi M, et al. Effects of intersubunit amino acid substitutions on GABA receptor sensitivity to the ectoparasiticide fluralaner. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 2020;163:123-9. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.11.001.
51. Marais E, Klok CJ, Terblanche JS, Chown SL. Insect gas exchange patterns: a phylogenetic perspective. *J Exp Biol.* 2005;208(23):4495-507. doi: 10.1242/jeb.01928. PubMed PMID: WOS:000234414800023.
52. Eguchi Y, Ihara M, Ochi E, Shibata Y, Matsuda K, Fushiki S, et al. Functional characterization of Musca glutamate- and GABA-gated chloride channels expressed independently and coexpressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Mol Biol.* 2006;15(6):773-83. doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00680.x. PubMed PMID: 17201770.
53. Cornejo I, Andrini O, Niemeyer MI, Maraboli V, Gonzalez-Nilo FD, Teulon J, et al. Identification and functional expression of a glutamate- and avermectin-gated chloride channel from *Caligus rogercresceyi*, a southern Hemisphere sea louse affecting farmed fish. *PLoS Pathog.* 2014;10(9):e1004402. doi: 10.1371/journal.ppat.1004402. PubMed PMID: 25255455; PubMed Central PMCID: PMC4177951.
54. Furutani S, Ihara M, Lees K, Buckingham SD, Partridge FA, David JA, et al. The fungal alkaloid Okaramine-B activates an L-glutamate-gated chloride channel from *Ixodes scapularis*, a tick vector of Lyme disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2018;8(2):350-60. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.06.001. PubMed PMID: 29957333; PubMed Central PMCID: PMC6039357.
55. Menard C, Folacci M, Brunello L, Charreton M, Collet C, Mary R, et al. Multiple combinations of RDL subunits diversify the repertoire of GABA receptors in the honey bee parasite *Varroa destructor*. *J Biol Chem.* 2018;293(49):19012-24. doi: 10.1074/jbc.RA118.005365. PubMed PMID: 30333227; PubMed Central PMCID: PMC6295728.

56. Chen R, Belelli D, Lambert JJ, Peters JA, Reyes A, Lan NC. Cloning and functional expression of a *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(13):6069-73. doi: 10.1073/pnas.91.13.6069. PubMed PMID: 8016117; PubMed Central PMCID: PMCPMC44139.
57. Xu ZF, Wu Q, Xu Q, He L. Functional Analysis Reveals Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid-Gated Chloride Channels as Targets of Avermectins in the Carmine Spider Mite. *Toxicol Sci*. 2017;155(1):258-69. doi: 10.1093/toxsci/kfw210. PubMed PMID: WOS:000397041300022.
58. Yang Y, Lv J, Gui B, Yin H, Wu X, Zhang Y, et al. A-to-I RNA editing alters less-conserved residues of highly conserved coding regions: implications for dual functions in evolution. *RNA*. 2008;14(8):1516-25. doi: 10.1261/rna.1063708. PubMed PMID: 18567816; PubMed Central PMCID: PMCPMC2491475.
59. Buckingham SD, Biggin PC, Sattelle BM, Brown LA, Sattelle DB. Insect GABA receptors: Splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol Pharmacol*. 2005;68(4):942-51. doi: 10.1124/mol.105.015313. PubMed PMID: WOS:000232002500003.
60. Jones AK, Sattelle DB. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*. 2007;8:327. doi: 10.1186/1471-2164-8-327. PubMed PMID: 17880682; PubMed Central PMCID: PMCPMC2064938.
61. Jones AK, Buckingham SD, Papadaki M, Yokota M, Sattelle BM, Matsuda K, et al. Splice-variant- and stage-specific RNA editing of the *Drosophila* GABA receptor modulates agonist potency. *J Neurosci*. 2009;29(13):4287-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5251-08.2009. PubMed PMID: 19339622; PubMed Central PMCID: PMCPMC6665385.
62. Taylor-Wells J, Senan A, Bermudez I, Jones AK. Species specific RNA A-to-I editing of mosquito RDL modulates GABA potency and influences agonistic, potentiating and antagonistic actions of ivermectin. *Insect Biochem Mol Biol*. 2018;93:1-11. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.12.001. PubMed PMID: 29223796.
63. Liu F, Shi XZ, Liang YP, Wu QJ, Xu BY, Xie W, et al. A 36-bp deletion in the alpha subunit of glutamate-gated chloride channel contributes to abamectin resistance in *Plutella xylostella*. *Entomol Exp Appl*. 2014;153(2):85-92. doi: 10.1111/eea.12232. PubMed PMID: WOS:000344386700001.
64. Mermans C, Dermauw W, Geibel S, Van Leeuwen T. A G326E substitution in the glutamate-gated chloride channel 3 (GluCl3) of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* abolishes the agonistic activity of macrocyclic lactones. *Pest Management Science*. 2017;73(12):2413-8. doi: 10.1002/ps.4677. PubMed PMID: WOS:000414177900003.
65. Wu SF, Mu XC, Dong YX, Wang LX, Wei Q, Gao CF. Expression pattern and pharmacological characterisation of two novel alternative splice variants of the glutamate-gated chloride channel in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*. *Pest Manag Sci*. 2017;73(3):590-7. doi: 10.1002/ps.4340. PubMed PMID: 27302648.
66. Atif M, Lynch JW, Keramidas A. The effects of insecticides on two splice variants of the glutamate-gated chloride channel receptor of the major malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Br J Pharmacol*. 2020;177(1):175-87. doi: 10.1111/bph.14855. PubMed PMID: 31479507; PubMed Central PMCID: PMCPMC6976876.
67. Garrood WT, Zimmer CT, Gutbrod O, Luke B, Williamson MS, Bass C, et al. Influence of the RDL A301S mutation in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* on the activity of phenylpyrazole insecticides. *Pestic Biochem Physiol*. 2017;142:1-8. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.01.007. PubMed PMID: 29107231; PubMed Central PMCID: PMCPMC5672059.
68. ffrench-Constant RH, Rocheleau TA. *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene *Rdl* shows extensive alternative splicing. *J Neurochem*. 1993;60(6):2323-6. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03523.x. PubMed PMID: 7684073.
69. Taylor-Wells J, Hawkins J, Colombo C, Bermudez I, Jones AK. Cloning and functional expression of intracellular loop variants of the honey bee (*Apis mellifera*) RDL GABA receptor. *Neurotoxicology*. 2017;60:207-13. doi: 10.1016/j.neuro.2016.06.007. PubMed PMID: WOS:000403133600025.
70. Jiang J, Huang LX, Chen F, Sheng CW, Huang QT, Han ZJ, et al. Novel alternative splicing of GABA receptor RDL exon 9 from *Laodelphax striatellus* modulates agonist potency. *Insect Sci*. 2020. doi: 10.1111/1744-7917.12789. PubMed PMID: 32293803.
71. Lindley D. Merck's new drug free to WHO for river blindness programme. *Nature*. 1987;329(6142):752. doi: 10.1038/329752a0. PubMed PMID: 3670379.

72. Chosidow O, Giraudeau B, Cottrell J, Izri A, Hofmann R, Mann SG, et al. Oral ivermectin versus malathion lotion for difficult-to-treat head lice. *N Engl J Med*. 2010;362(10):896-905. doi: 10.1056/NEJMoa0905471. PubMed PMID: 20220184.
73. Ahmad HM, Abdel-Azim ES, Abdel-Aziz RT. Assessment of topical versus oral ivermectin as a treatment for head lice. *Dermatol Ther*. 2014;27(5):307-10. doi: 10.1111/dth.12144. PubMed PMID: 25041547.
74. Leulmi H, Diatta G, Sokhna C, Rolain JM, Raoult D. Assessment of oral ivermectin versus shampoo in the treatment of pediculosis (head lice infestation) in rural areas of Sine-Saloum, Senegal. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):627-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.07.014. PubMed PMID: 27866866.
75. Yoon KS, Strycharz JP, Baek JH, Sun W, Kim JH, Kang JS, et al. Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance. *Insect Mol Biol*. 2011;20(6):687-99. doi: 10.1111/j.1365-2583.2011.01097.x. PubMed PMID: 21895817; PubMed Central PMCID: PMC3208734.
76. Wei PL, Che WA, Wang JD, Xiao D, Wang R, Luo C. RNA interference of glutamate-gated chloride channel decreases abamectin susceptibility in *Bemisia tabaci*. *Pestic Biochem Phys*. 2018;145:1-7. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.12.004. PubMed PMID: WOS:000428601100001.
77. Kane NS, Hirschberg B, Qian S, Hunt D, Thomas B, Brochu R, et al. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *P Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13949-54. doi: DOI 10.1073/pnas.240464697. PubMed PMID: WOS:000165728800088.
78. Fuse T, Kita T, Nakata Y, Ozoe F, Ozoe Y. Electrophysiological characterization of ivermectin triple actions on *Musca* chloride channels gated by L-glutamic acid and gamma-aminobutyric acid. *Insect Biochem Molec*. 2016;77:78-86. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.08.005. PubMed PMID: WOS:000385321700008.
79. Wang XL, Puinean AM, O'Reilly AO, Williamson MS, Smelt CLC, Millar NS, et al. Mutations on M3 helix of *Plutella xylostella* glutamate-gated chloride channel confer unequal resistance to abamectin by two different mechanisms. *Insect Biochem Molec*. 2017;86:50-7. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.05.006. PubMed PMID: WOS:000405055100006.
80. Yamato K, Nakata Y, Takashima M, Ozoe F, Asahi M, Kobayashi M, et al. Effects of intersubunit amino acid substitutions on GABA receptor sensitivity to the ectoparasiticide fluralaner. *Pestic Biochem Physiol*. 2020;163:123-9. doi: 10.1016/j.pestbp.2019.11.001. PubMed PMID: 31973848.
81. Little SE. Lotilaner - a novel systemic tick and flea control product for dogs. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):539. doi: 10.1186/s13071-017-2471-3. PubMed PMID: 29089062; PubMed Central PMCID: PMC5664799.
82. Cavalleri D, Murphy M, Seewald W, Drake J, Nanchen S. A randomised, blinded, controlled field study to assess the efficacy and safety of lotilaner tablets (Credelio) in controlling fleas in client-owned dogs in European countries. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):526. doi: 10.1186/s13071-017-2479-8. PubMed PMID: 29089065; PubMed Central PMCID: PMC5664837.
83. Murphy M, Garcia R, Karadzovska D, Cavalleri D, Snyder D, Seewald W, et al. Laboratory evaluations of the immediate and sustained efficacy of lotilaner (Credelio) against four common species of ticks affecting dogs in North America. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):523. doi: 10.1186/s13071-017-2476-y. PubMed PMID: 29089057; PubMed Central PMCID: PMC5664823.
84. Miglianico M, Eldering M, Slater H, Ferguson N, Ambrose P, Lees RS, et al. Repurposing isoxazoline veterinary drugs for control of vector-borne human diseases. *P Natl Acad Sci USA*. 2018;115(29):E6920-E6. doi: 10.1073/pnas.1801338115. PubMed PMID: WOS:000438892600031.
85. Kohler-Aanesen H, Saari S, Armstrong R, Pere K, Taenzler J, Zschiesche E, et al. Efficacy of fluralaner (Bravecto chewable tablets) for the treatment of naturally acquired *Linognathus setosus* infestations on dogs. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):426. doi: 10.1186/s13071-017-2344-9. PubMed PMID: 28923117; PubMed Central PMCID: PMC5604360.
86. Fisara P, Guerino F, Sun FS. Efficacy of a spot-on combination of fluralaner plus moxidectin (Bravecto((R)) Plus) in cats following repeated experimental challenge with a field isolate of *Ctenocephalides felis*. *Parasite Vector*. 2019;12. doi: ARTN 259
10.1186/s13071-019-3512-x. PubMed PMID: WOS:000468877400001.
87. Geurden T, Borowski S, Wozniakiewicz M, King V, Fourie J, Liebenberg J. Comparative efficacy of a new spot-on combination product containing selamectin and sarolaner (Stronghold (R) Plus) versus fluralaner

(Bravecto (R)) against induced infestations with *Ixodes ricinus* ticks on cats. *Parasite Vector*. 2017;10. doi: ARTN 319

10.1186/s13071-017-2259-5. PubMed PMID: WOS:000405900300003.

88. Vatta AF, King VL, Young DR, Chapin S. Efficacy of three consecutive monthly doses of a topical formulation of selamectin and sarolaner (Revolution((R)) Plus/Stronghold((R)) Plus) compared with a single dose of fluralaner (Bravecto((R)) for Cats) against induced infestations of *Ctenocephalides felis* on cats. *Vet Parasitol*. 2019;270 Suppl 1:S52-S7. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.05.004. PubMed PMID: 31133494.

89. Mumcuoglu KY, Danilevich M, Zelig O, Grinbaum H, Friger M, Meinking TL. Effects of blood type and blood handling on feeding success, longevity and egg production in the body louse, *Pediculus humanus humanus*. *Med Vet Entomol*. 2011;25(1):12-6. doi: 10.1111/j.1365-2915.2010.00897.x. PubMed PMID: 20678099.

90. Courtot E, Charvet CL, Beech RN, Harmache A, Wolstenholme AJ, Holden-Dye L, et al. Functional Characterization of a Novel Class of Morantel-Sensitive Acetylcholine Receptors in Nematodes. *PLoS Pathog*. 2015;11(12):e1005267. doi: 10.1371/journal.ppat.1005267. PubMed PMID: 26625142; PubMed Central PMCID: PMC4666645.

91. Boulin T, Fauvin A, Charvet CL, Cortet J, Cabaret J, Bessereau JL, et al. Functional reconstitution of *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. *Br J Pharmacol*. 2011;164(5):1421-32. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01420.x. PubMed PMID: 21486278; PubMed Central PMCID: PMC3221097.

92. Charvet CL, Guegnard F, Courtot E, Cortet J, Neveu C. Nicotine-sensitive acetylcholine receptors are relevant pharmacological targets for the control of multidrug resistant parasitic nematodes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018;8(3):540-9. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.11.003. PubMed PMID: 30502120; PubMed Central PMCID: PMC6287576.

93. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011;8(10):785-6. doi: 10.1038/nmeth.1701. PubMed PMID: 21959131.

94. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):5857-64. doi: 10.1073/pnas.95.11.5857. PubMed PMID: 9600884; PubMed Central PMCID: PMC34487.

95. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1792-7. doi: 10.1093/nar/gkh340. PubMed PMID: 15034147; PubMed Central PMCID: PMC390337.

96. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*. 2010;27(2):221-4. doi: 10.1093/molbev/msp259. PubMed PMID: 19854763.

97. Abongwa M, Buxton SK, Courtot E, Charvet CL, Neveu C, McCoy CJ, et al. Pharmacological profile of *Ascaris suum* ACR-16, a new homomeric nicotinic acetylcholine receptor widely distributed in *Ascaris* tissues. *Br J Pharmacol*. 2016;173(16):2463-77. doi: 10.1111/bph.13524. PubMed PMID: 27238203; PubMed Central PMCID: PMC4959957.

Figure legends

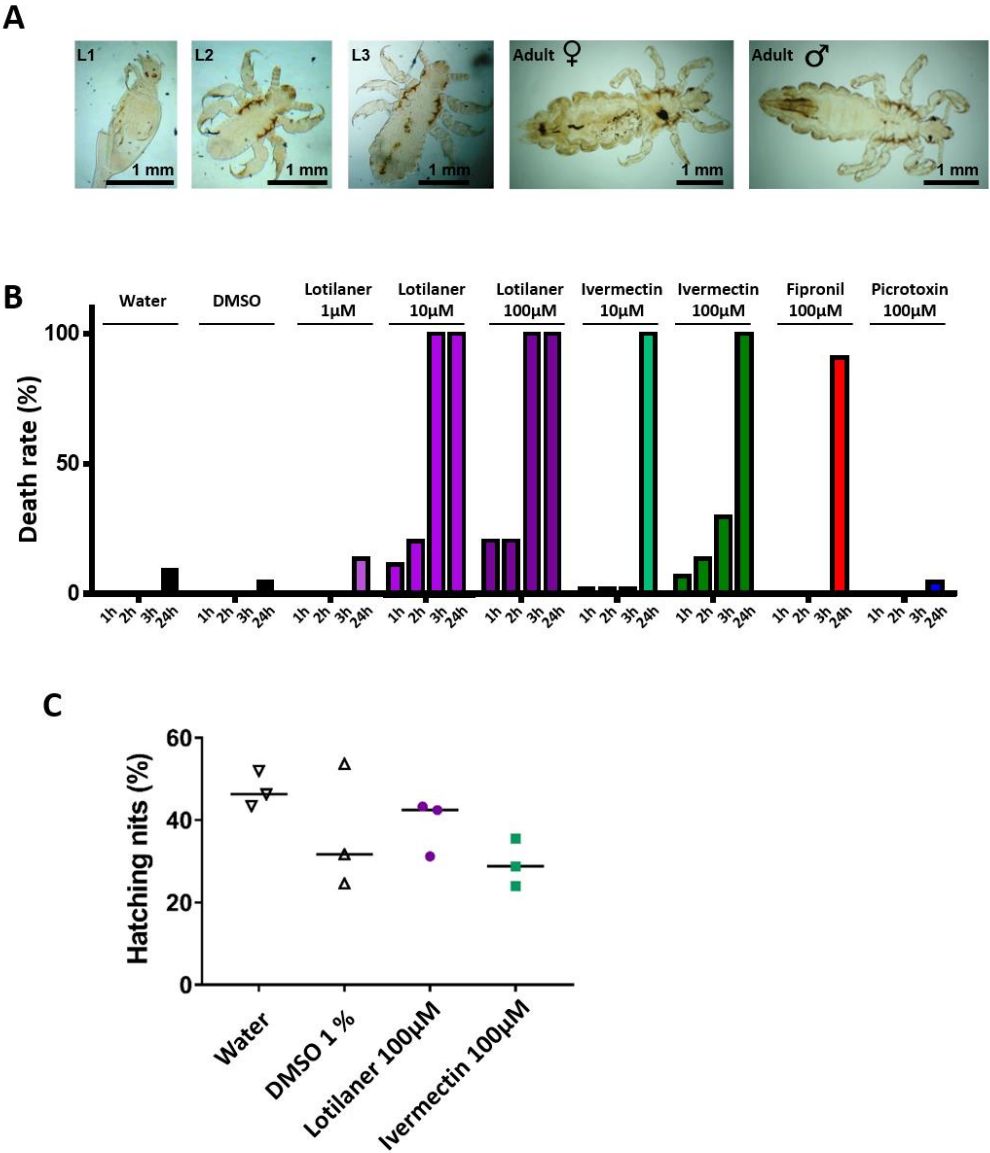


Fig. 1: Toxicity tests on lice *in vivo*.

A. Photographs of the human body lice from the laboratory-reared colony used in this study. Different life stages are represented from the left to the right: larvae in stage 1 during hatching, larvae in stage 2, larvae in stage 3, female adult, male adult.

B. Adult lice (n = 44 per condition) were treated with different concentrations of lotilaner, ivermectin, fipronil or picrotoxin and survival/immobilization (knockdown) rate was determined throughout 24 hours. Water and 1 % DMSO were used as negative controls.

C. Nits were treated with 100µM of lotilaner or ivermectin and hatching was determined throughout several days. Water and 1 % DMSO were used as negative controls. The results are expressed as percentage of hatching from three independent experiments with n = 50 to 190 nits. The results are representative of three independent experiments.

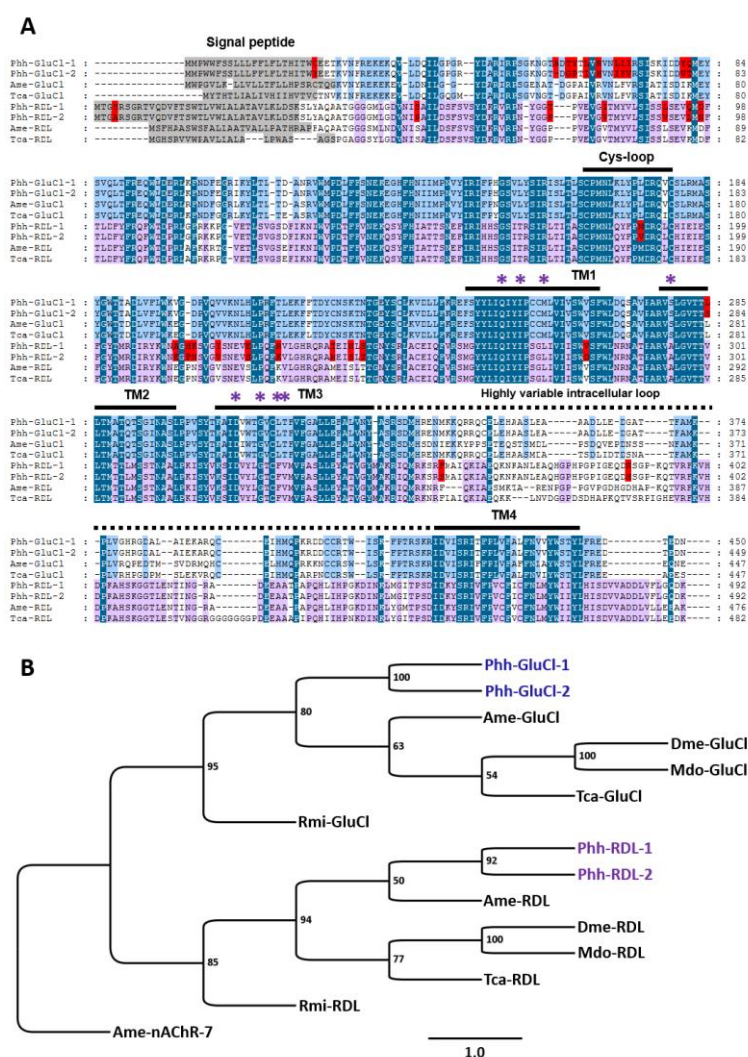


Fig. 2: Comparison of GluCl and RDL sequences from lice

A. Amino acid alignments of GluCl and RDL subunit sequences of *Pediculus humanus humanus*, *Apis mellifera* and *Tribolium castaneum*. Predicted signal peptides in the N-terminal region are highlighted in grey. Amino acid differences between Phh-GluCl-1 and Phh-GluCl-2 or between Phh-RDL-1 and Phh-RDL-2 sequences of *P. humanus humanus* are highlighted in red. Cys-loop domain, predicted transmembrane domains TM1 to TM4 and the highly variable intracellular loop are indicated by the bars. Amino acids conserved between all the sequences are highlighted in dark blue. Amino acids conserved between GluCl sequences are highlighted in light blue. Amino acids conserved between RDL sequences are highlighted in pink. Purple asterisks represent amino acid docking for fluralaner based on previous studies (Yamato et al, 2020).

B. Distance tree (BioNJ, Poisson) of GluCl and RDL protein sequences from insects and acarians. The three letter prefixes in gene names Phh, Ame, Tca, Dme, Mdo and Rmi refer to the species *Pediculus humanus humanus*, *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum*, *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica* and *Rhipicephalus microplus*, respectively. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site. Scale bar represents the number of substitutions per site. The bootstrap values are indicated next to each branch. Accession numbers for sequences used in the phylogenetic analysis are provided in the Methods section. Sequences of *P. humanus humanus* are highlighted in blue for GluCl and purple for RDLs. The *A. mellifera* alpha7 nAChR subunit sequence was used as an outgroup.

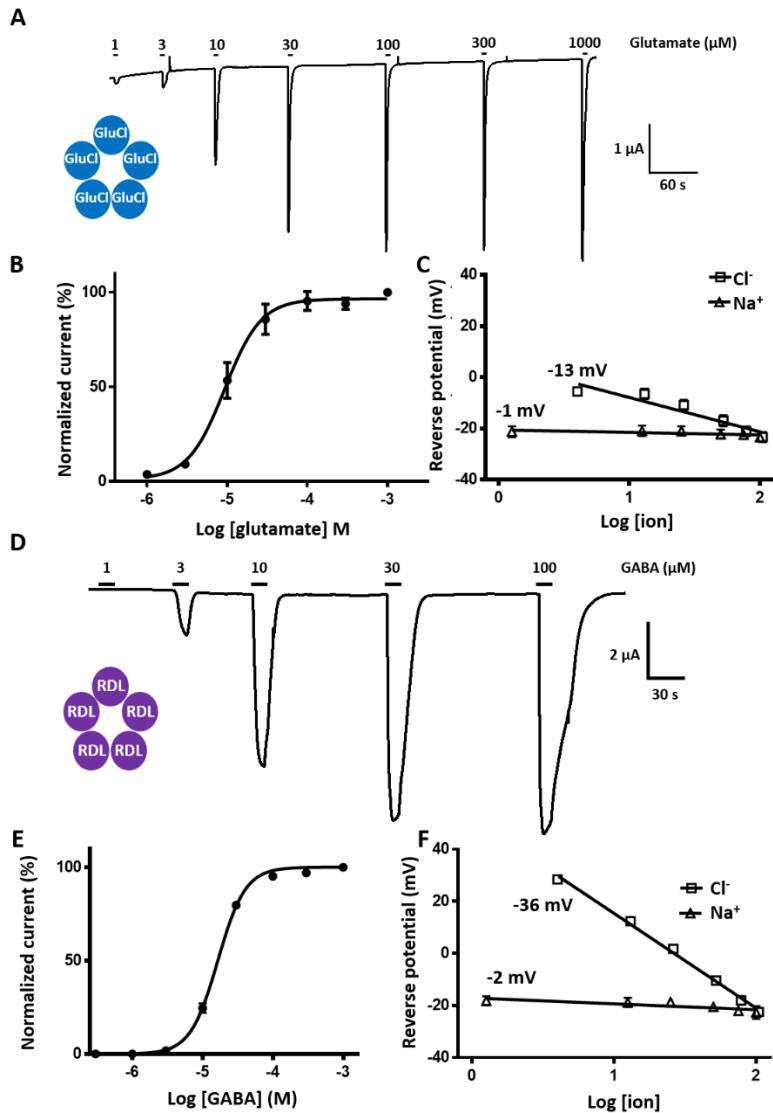


Fig. 3: Functional expression of Phh-GluCl and Phh-RDL channels in *X. laevis* oocytes.

A. Electrophysiological recording traces of oocytes injected with Phh-GluCl cRNA in response to the application of 1 to 1000 μM of glutamate. Oocytes were clamped at -80 mV . Application times are indicated by the bar.

B. Glutamate concentration-response curve for Phh-GluCl (mean $\pm$ SEM, $n = 5$ oocytes). Data were normalized to the maximal effect of glutamate.

C. Reverse potential-ion concentration relationships of oocytes expressing Phh-GluCl obtained from voltage-ramps in presence of glutamate and using increasing concentrations of either Cl^- or Na^+ to analyze the selectivity of this channel.

D. Electrophysiological recording traces of oocytes injected with Phh-RDL cRNA in response to the application of 1 to 100 μM of GABA. Oocytes were clamped at -60 mV . Application times are indicated by the bars.

E. GABA concentration response curve for Phh-RDL (mean $\pm$ SEM, $n = 6$ oocytes). Data were normalized to the maximal effect of GABA.

F. Reverse potential-ion concentration relationships of oocytes expressing Phh-RDL obtained from voltage-ramps in presence of GABA and using increasing concentrations of either Cl^- or Na^+ to analyze the selectivity of this channel.

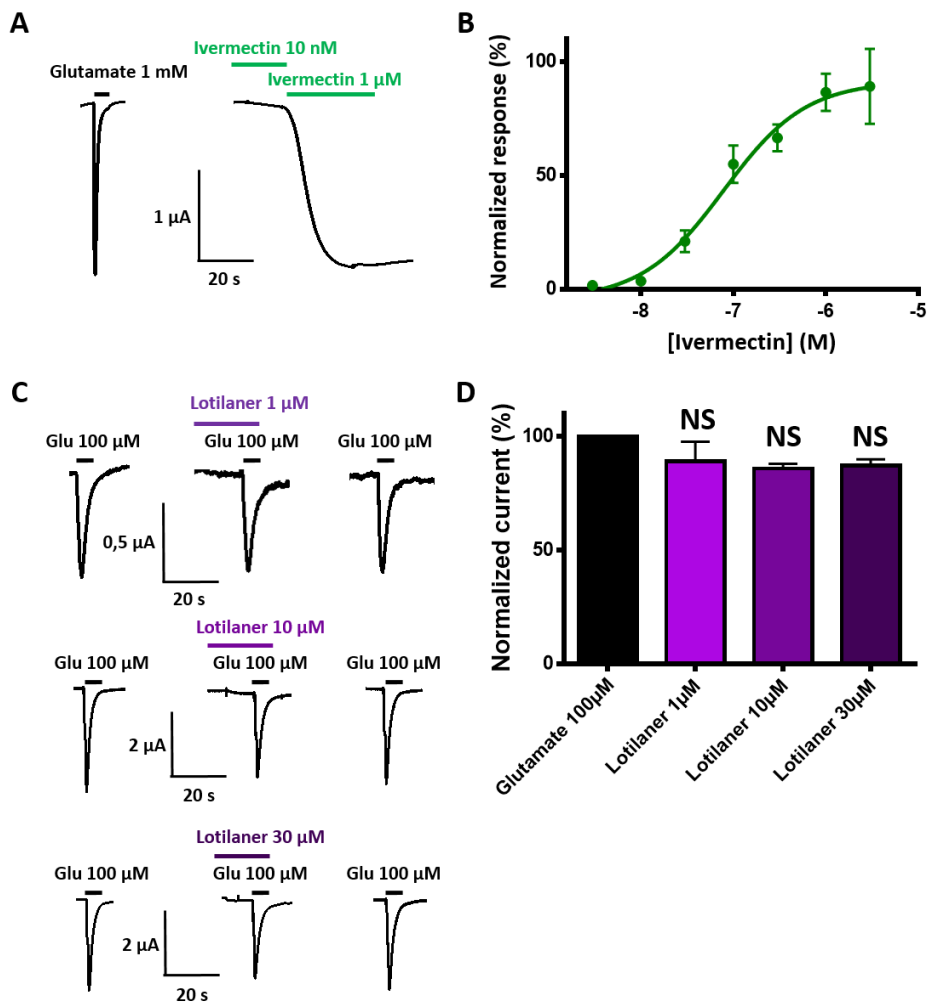


Fig. 4: Effects of ivermectin and lotilaner on Phh-GluCl receptor in *X. laevis* oocytes.

A. Representative recording traces from a single oocyte expressing Phh-GluCl challenged with 1 mM glutamate and 10 nM ivermectin followed by 1 μM ivermectin. The bars indicate the time period of agonist application.

B. Ivermectin concentration-response curve for Phh-GluCl (mean $\pm$ SEM, $n = 5$ oocytes). Data were normalized to the current amplitude of a first application of glutamate 100 μM.

C. Representative recording traces from oocytes perfused with 100 μM glutamate (Glu) alone (left), with 1-30 μM lotilaner prior to co-application with 100 μM Glu (middle) and after wash out (right).

D. Bar chart (mean $\pm$ SEM, $n = 5$) of the response elicited by 100 μM glutamate in coapplication with 1 – 30 μM lotilaner normalized to and compared with the response to 100 μM glutamate (One-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparisons Test, NS : Not Significant).

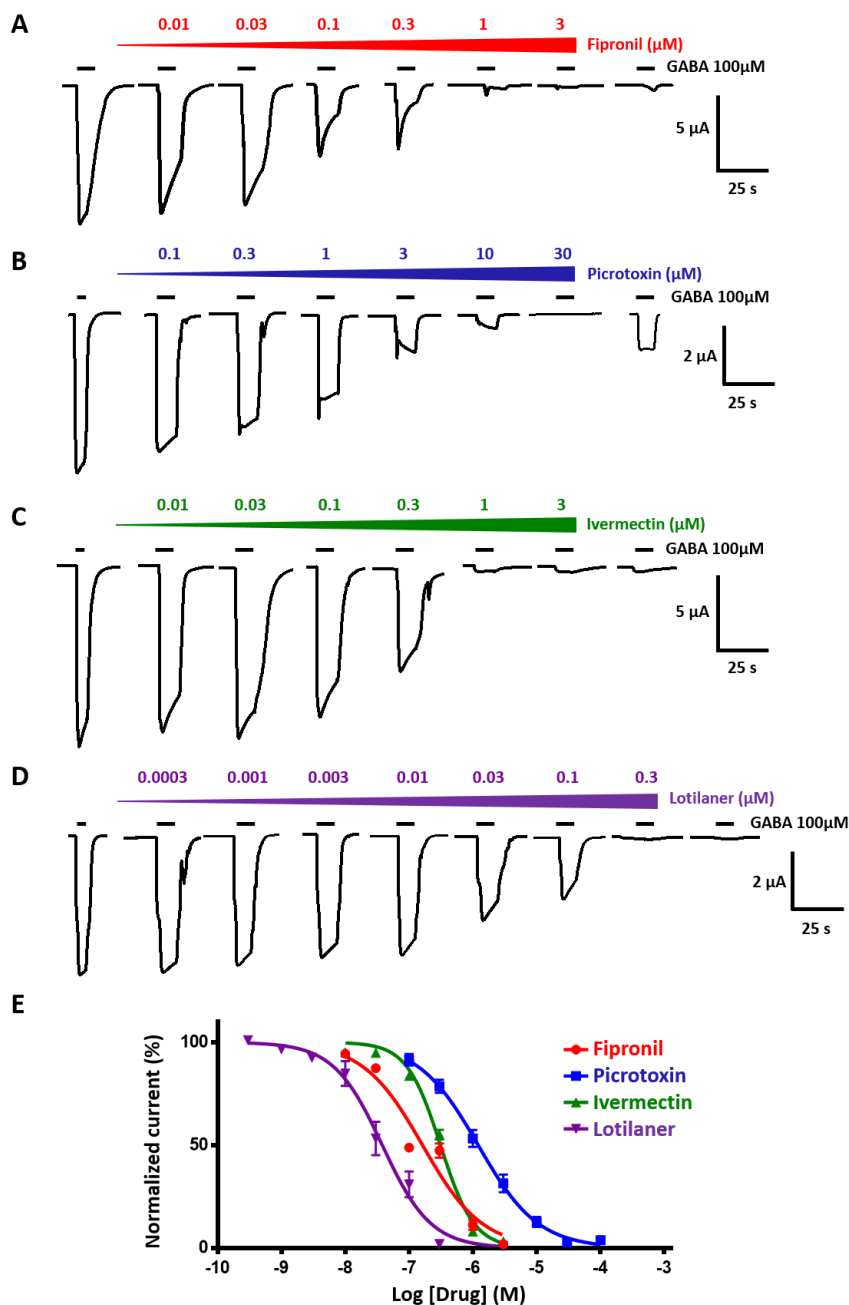


Fig. 5: Antagonistic effects of fipronil, picrotoxin, ivermectin and lotilaner on GABA-elicited currents in *X. laevis* oocytes expressing Phh-RDL receptor.

A-D. Representative current traces evoked by 100 μM GABA alone or with coapplication of an increasing concentration of fipronil, picrotoxin, ivermectin and lotilaner. After antagonist application, a last 100 μM GABA application was performed to assess their reversible potential. Application times are indicated by the bars.

E. Concentration-inhibition curves for Phh-RDL for fipronil (red circles, $n = 6-7$), picrotoxin (blue squares, $n = 6$), ivermectin (green triangles, $n = 6$) and lotilaner (purple triangles, $n = 6$). Data are all normalized to the response to 100 μM GABA (mean $\pm$ SEM).

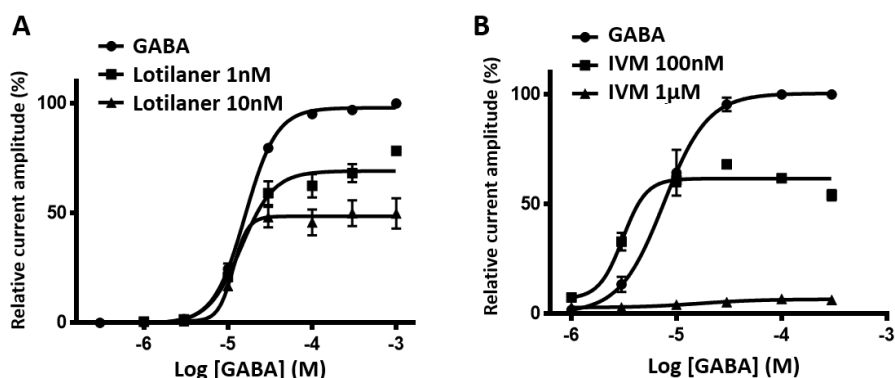


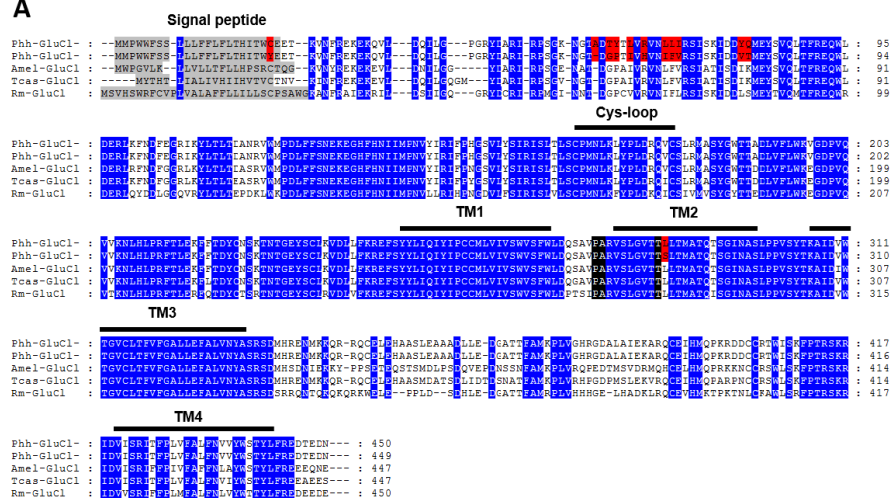
Fig. 6 : Competitive assay for lotilaner and ivermectin on Phh-RDL

A. Lotilaner is a non-competitive antagonist of Phh-RDL. GABA concentration response were performed with GABA alone (black circles) or with lotilaner at 1 nM (black squares) and 10 nM (black triangles). Comparison of GABA EC_{50} and maximum response to a saturated GABA concentration highlight the activity of lotilaner as a non-competitive antagonist of Phh-RDL. Data were normalized to a first application of 100 μ M GABA (mean $\pm$ SEM, $n = 5-6$).

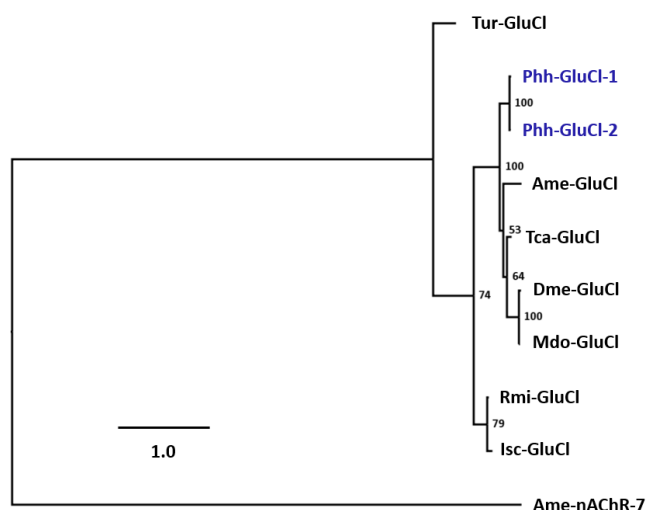
B. Dual action of ivermectin on Phh-RDL. GABA concentration response were performed with GABA alone (black circles) or with ivermectin at 100 nM (black squares) and 1 μ M (black triangles). Depending on the concentration, ivermectin potentiates the GABA response, activates Phh-RDL or antagonizes the GABA response. Data were normalized to a first application of 100 μ M GABA (mean $\pm$ SEM, $n = 5-6$).

Supporting information

A



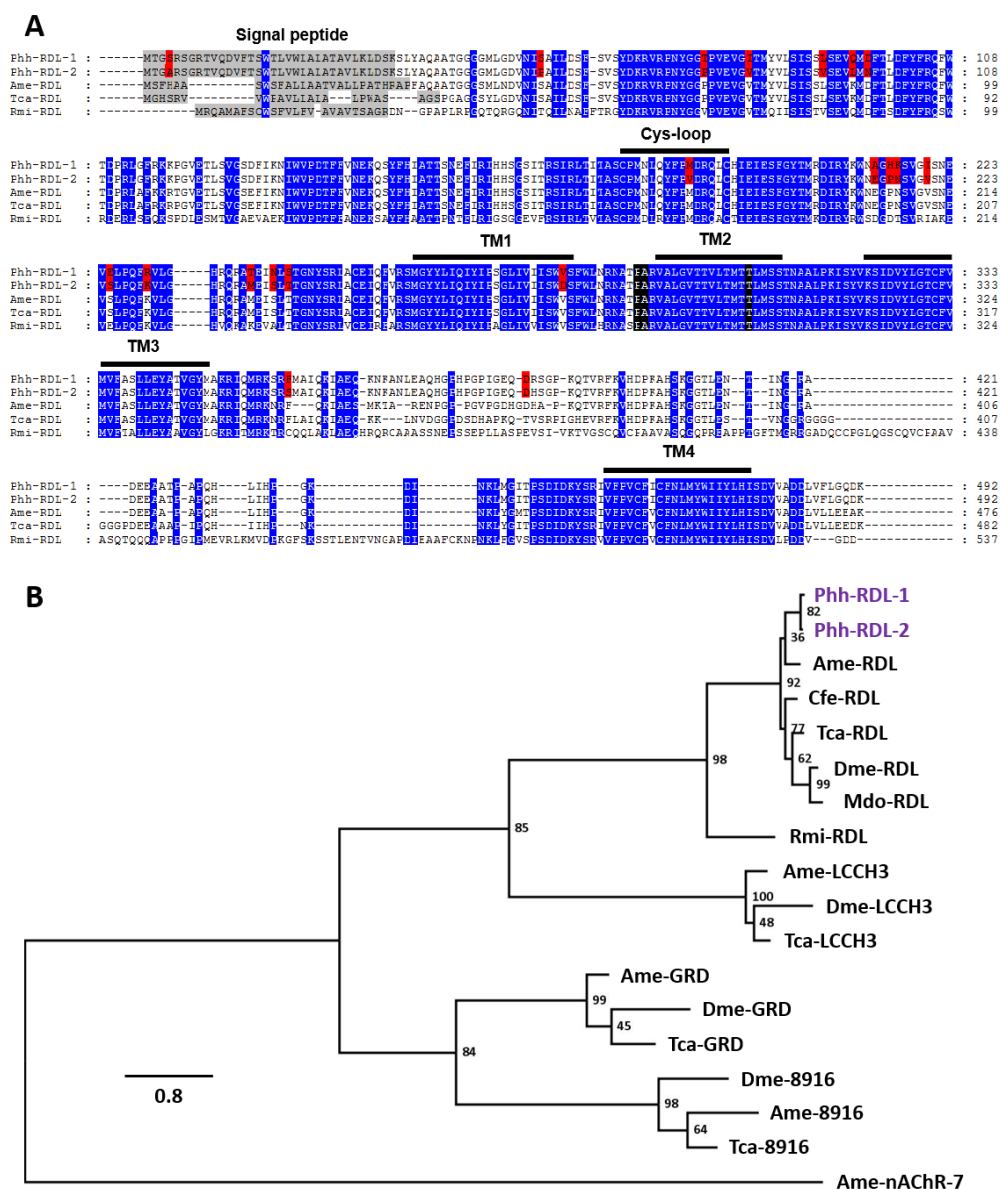
B



S1 Fig.: Comparison of insect and acari GluCl subunits.

A. Alignment of GluCl subunit deduced amino-acid sequences from *Pediculus humanus humanus* (Phh), *Apis mellifera* (Ame), *Rhipicephalus microplus* (Rmi) and *Tribolium castaneum* (Tca). Predicted signal peptides in N-terminal are highlighted in grey. Amino acid differences between the GluCl-1 and GluCl-2 sequences of *P. humanus* are highlighted in red. Amino acids conserved between all the sequences are highlighted in blue. The cysteine loop, transmembrane domains (TM1-TM4) and the highly variable intracellular loop are indicated by the bars.

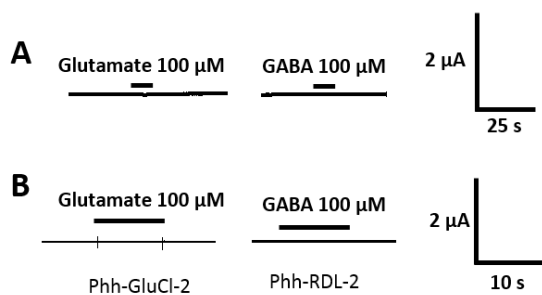
B. Distance tree (BioNJ, Poisson) of GluCl protein sequences from insects and acari. The three letter prefixes in gene names Tur, Phh, Ame, Tca, Dme, Mdo, Rmi and Isc refer to the species *Tetranychus urticae*, *Pediculus humanus humanus*, *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum*, *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica*, *Rhipicephalus microplus* and *Ixodes scapularis*, respectively. The tree was rooted with the *A. mellifera* alpha7 nAChR subunit as an outgroup. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per amino acid. Scale bar represents the number of substitutions per site. The bootstrap values are indicated next to each branch. Accession numbers for sequences used in the phylogenetic analysis are provided in the Methods section. The two GluCl sequences of interest are highlighted in blue.



S2 Fig.: Comparison of insect and acari GABA subunits.

A. Alignment of RDL subunit deduced amino-acid sequences from *Pediculus humanus humanus* (Phh), *Apis mellifera* (Ame), *Tribolium castaneum* (Tca) and *Rhipicephalus microplus* (Rmi). Predicted signal peptides in N-terminal are highlighted in grey. Amino acid difference between the RDL-1 and RDL-2 sequences of *P. humanus* are highlighted in red. Amino acids conserved between all the sequences are highlighted in blue. The cys-loop, predicted transmembrane domains (TM1-TM4) and the highly variable intracellular loop are indicated by the bars.

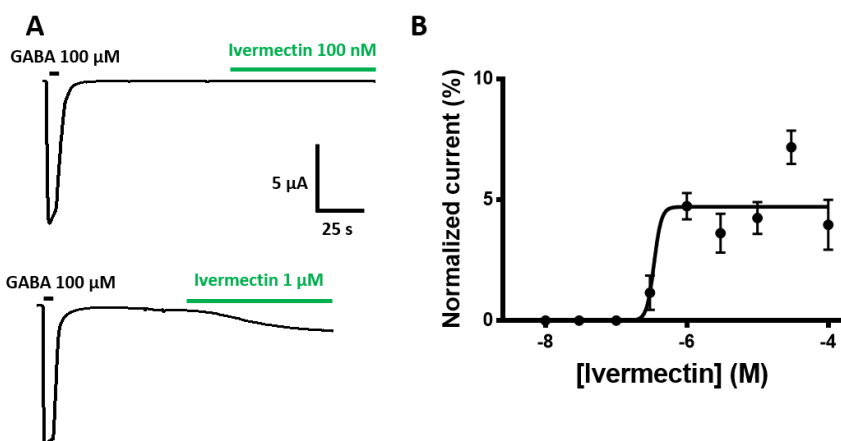
B. Distance tree (BioNJ, Poisson) of GABACI protein sequence from insects and acari. The three letter prefixes in gene names Phh, Ame, Cfe, Tca, Dme, Mdo and Rmi refer to the species *Pediculus humanus humanus*, *Apis mellifera*, *Ctenocephalides felis*, *Tribolium castaneum*, *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica* and *Rhipicephalus microplus*, respectively. The tree was rooted with the *A. mellifera* alpha7 nAChR subunit as an outgroup. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per amino acid. Scale bar represents the number of substitutions per site. The bootstrap values are indicated next to each branch. Accession numbers for sequences used in the phylogenetic analysis are provided in the Methods section. The two RDL sequences of interest are highlighted in purple.



S3 Fig.: Current traces of uninjected oocytes and oocytes injected with Phh-GluCl-2 or Phh-RDL-2.

A. Current traces of uninjected oocytes after application of glutamate and GABA at 100 μ M. The bar indicates the application time of 10 s.

B. For Phh-GluCl-2, oocytes were clamped at -80mV and response to 100 μ M of glutamate was measured (n = 11). For Phh-RDL-2, oocytes were clamped at -60mV and response to 100 μ M of GABA was measured (n = 12). The bar indicates the application time of 10 s.



S4 Fig.: Agonistic effect of ivermectin on GABA-elicited currents in *X. laevis* oocytes expressing Phh-RDL receptor.

A. Representative current traces evoked by 100 μ M GABA followed by 90 s application of 100 nM or 1 μ M ivermectin. Application times are indicated by the bars.

B. Concentration response curve of the ivermectin agonist effect. Data are normalized to a first 100 μ M GABA application (mean $\pm$ SEM, $n = 5-13$)

S1 Table: Knockdown groups. Lice from groups KD⁺⁺⁺ and KD⁺⁺⁺⁺ were considered as dead [12]

Treatment			Number of dead adult lice (% of dead lice)				Percentage of hatching (3 independent experiments)		
	Concentration		Application time						
	μM	ppm	1h	2h	3h	24h			
Water			0/44 (0)	0/44 (0)	0/44 (0)	4/44 (9.1)	43.4	51.9	46.3
DMSO	1%		0/44 (0)	0/44 (0)	0/44 (0)	2/44 (4.6)	24.6	31.7	53.7
Lotilaner	1 μM	0.6	0/44 (0)	0/44 (0)	0/44 (0)	6/44 (13.6)	ND		
Lotilaner	10 μM	6	5/44 (11.4)	9/44 (20.5)	44/44 (100)	44/44 (100)	ND		
Lotilaner	100 μM	60	9/44 (20.5)	9/44 (20.5)	44/44 (100)	44/44 (100)	31.2	42.4	43.3
Ivermectin	10 μM	8.9	1/44 (2.3)	1/44 (2.3)	1/44 (2.3)	44/44 (100)	ND		
Ivermectin	100 μM	89	3/44 (6.8)	6/44 (13.6)	13/44 (29.6)	44/44 (100)	24	28.8	35.5
Fipronil	100 μM	43.7	0/44 (0)	0/44 (0)	0/44 (0)	40/44 (90.9)	ND		
Picrotoxin	100 μM	60	0/44 (0)	0/44 (0)	0/44 (0)	2/44 (4.6)	ND		

S2 Table: Rates of mortality of *P. humanus humanus* exposed to lotilaner, ivermectin, fipronil and picrotoxin

Gene name	Primer name	Primer sequence
<i>GluCI</i>	Phh-GluCI-R1	CGAAATGTCAGCTGAACGCTG
	Phh-GluCI-R2	CTTCGGACAAACATGTAACTCG
	Phh-GluCI-F0	TTGGGAAAAGCCATTGAAGAG
	Phh-GluCI-Z1R	CCAACGACGGCAATTATAAGC
	FuPhh-GluCI-pTB-XhoF	CTGGCGGCCGCTCGAGATGATGCCGTGGTGGTTCAGT
	FuPhh-GluCI-pTB-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCTTAATTATCTTCCGTATCTTCTCT
<i>rdl</i>	Phh-rdl-R1	GATATCGAAAGGACGTACATGGT
	Phh-rdl-R2	CGGAGATATTGACATCACCTAAC
	Phh-rdl-F0	GGTCATGATGTATCCGTCGTCA
	Phh-rdl-Z1R	AGCGTGTTTTTCGATATTTAAAAATT
	FuPhh-rdl-pTB-XhoF	CTGGCGGCCGCTCGAGAAGATGACGGGAGCACGCAGT
	FuPhh-rdl-pTB-ApaR	ACCAGATCAAGCTCGGGCCCGATGAATTTATTTATCTTGTCCCAA

S3 Table: Primers used for the PCR and cloning of *P. humanus humanus* GluCI and RDL subunits

Author contributions

Contributor Role	Role Definition
Conceptualization	Ideas; formulation or evolution of overarching research goals and aims. Nicolas Lamassiaude ¹ , Berthine Toubate ² , Cédric Neveu ¹ , Françoise Debierre-Grockiego ² , Claude Charvet ¹ Isabelle Dimier-Poisson ²
Data Curation	Management activities to annotate (produce metadata), scrub data and maintain research data (including software code, where it is necessary for interpreting the data itself) for initial use and later reuse.
Formal Analysis	Application of statistical, mathematical, computational, or other formal techniques to analyze or synthesize study data. Nicolas Lamassiaude ¹ , Berthine Toubate ² , Françoise Debierre-Grockiego ² , Pierre Charnet ³ , Claude Charvet ¹
Funding Acquisition	Acquisition of the financial support for the project leading to this publication. Cédric Neveu ¹ , Berthine Toubate ² , Isabelle Dimier-Poisson ²
Investigation	Conducting a research and investigation process, specifically performing the experiments, or data/evidence collection. Nicolas Lamassiaude ¹ , Berthine Toubate ² , Pierre Charnet ³ , Catherine Dupuy ² , Claude Charvet ¹
Methodology	Development or design of methodology; creation of models Nicolas Lamassiaude ¹ , Berthine Toubate ² , Cédric Neveu ¹ , Françoise Debierre-Grockiego ² , Claude Charvet ¹ Isabelle Dimier-Poisson ²
Project Administration	Management and coordination responsibility for the research activity planning and execution. Claude Charvet ¹ , Isabelle Dimier-Poisson ²
Resources	Provision of study materials, reagents, materials, patients, laboratory samples, animals, instrumentation, computing resources, or other analysis tools. Berthine Toubate ² , Cédric Neveu ¹ , Claude Charvet ¹ , Isabelle Dimier-Poisson ²
Software	Programming, software development; designing computer programs; implementation of the computer code and supporting algorithms; testing of existing code components.
Supervision	Oversight and leadership responsibility for the research activity planning and execution, including mentorship external to the core team. Claude Charvet ¹ , Isabelle Dimier-Poisson ²
Validation	Verification, whether as a part of the activity or separate, of the overall replication/reproducibility of results/experiments and other research outputs. Nicolas Lamassiaude ¹ , Berthine Toubate ² , Pierre Charnet ³ , Cédric Neveu ¹ , Françoise Debierre-Grockiego ² , Claude Charvet ¹ , Isabelle Dimier-Poisson ²
Visualization	Preparation, creation and/or presentation of the published work, specifically visualization/data presentation. Nicolas Lamassiaude ¹ , Berthine Toubate ² , Françoise Debierre-Grockiego ²
Writing – Original Draft Preparation	Creation and/or presentation of the published work, specifically writing the initial draft (including substantive translation). Nicolas Lamassiaude ¹
Writing – Review & Editing	Preparation, creation and/or presentation of the published work by those from the original research group, specifically critical review, commentary or revision – including pre- or post-publication stages. Nicolas Lamassiaude ¹ , Berthine Toubate ² , Cédric Neveu ¹ , Françoise Debierre-Grockiego ² , Claude Charvet ¹ , Isabelle Dimier-Poisson ²

DISCUSSION GENERALE

Le contrôle des parasites invertébrés impactant la santé humaine et animale, qu'ils soient des nématodes, des insectes ou des acariens, repose principalement sur l'utilisation d'antiparasitaires du fait de l'absence de vaccin et d'une faible efficacité des moyens de lutte alternatifs. Parmi les traitements disponibles, les lactones macrocycliques (MLs) ont révolutionné la lutte antiparasitaire grâce à leur large spectre d'activité contre les invertébrés (endo- et ectoparasites) (98). Cependant, l'utilisation massive des antiparasitaires dans de nombreux domaines tels que l'agriculture ou la médecine humaine et vétérinaire a irrémédiablement conduit à l'apparition de parasites résistants à une ou plusieurs familles de molécules (MLs, benzimidazole et pyrantel dans le cas de *Parascaris sp.*) pouvant mener à des impasses thérapeutiques (311). Actuellement, de nombreux traitements antiparasitaires ciblent le système nerveux des parasites et plus particulièrement les LGICs (200,272). C'est notamment le cas des MLs qui ciblent principalement les canaux chlorure glutamate dépendant (GluCls) et dans une moindre mesure les récepteurs au GABA. Sur les GluCls, les MLs agissent comme des agonistes (121,206) et activent les récepteurs de façon irréversible, inhibant ainsi la transmission neuronale et neuromusculaire (207–209) et conduisant à une paralysie flasque puis à la mort du parasite (17).

Chez les nématodes, 8 gènes codant des GluCls ont été décrits (115). Chez les insectes, le nombre de GluCls est plus réduit avec un seul gène codant pour une sous-unité de GluCl. Cependant, les transcrits de ce gène sont sujets à de nombreux épissages alternatifs et autres modifications post-transcriptionnelles (A-to-I editing) (219,251) augmentant ainsi le nombre de sous-unités de GluCls. A cette diversité de sous-unités, s'ajoute également une diversité potentielle de sous-type de récepteurs dépendant de leur composition en sous-unités (121,170,177). Malgré cette grande diversité potentielle, un nombre restreint de GluCls d'arthropodes a pu être caractérisé (116,134,148,149,218,242–246,248) et la caractérisation de GluCls de nématode s'est surtout focalisée sur ceux du nématode modèle *C. elegans* (17,121,171,207,227) et du nématode parasite *H. contortus* (18,176,177,229–231,237) qui sont tous deux des nématodes de clade V. Par conséquent, nos connaissances sur les cibles pharmacologiques des MLs ainsi que leur mode d'action restent limitées pour beaucoup de parasites de grande importance en santé humaine et animale.

Dans ce contexte, mon projet de thèse était d'identifier les sous-unités de GluCls de nématodes (*B. malayi*, *P. univalens* et *C. elegans*) et d'insectes (*P. humanus humanus*) et de caractériser ces récepteurs au niveau moléculaire et fonctionnel. Cela a permis d'approfondir les connaissances du mode d'action des MLs sur les nématodes et les insectes, ainsi que d'identifier de nouveaux sous-types de GluCls chez le pou humain *P. humanus humanus*, chez les nématodes parasites *B. malayi* et *P. univalens* mais également chez le nématode modèle *C. elegans* montrant ainsi que la diversité de composition et de fonction des GluCls est plus complexe qu'il n'y paraît.

I. Sous-unités de GluCl conservées chez les nématodes

A. Sous-unité de GluCl cœurs

Les GluCls de nématodes ont été plus particulièrement étudiés chez deux nématodes majeurs du clade V que sont *C. elegans* (17,121,171,207,227) et *H. contortus* (18,176,177,229–231,237) en termes de fonctionnalité des sous-unités, de localisation, d'implication potentielle dans la résistance aux MLs etc...

Chez *C. elegans*, six gènes codant des GluCls ont été identifiés et nommés *avr-14* (17,171), *avr-15* (207,233), *glc-1* (121,312), *glc-2* (121), *glc-3* (227) et *glc-4* (11). A cela s'ajoute les deux autres sous-unités décrites uniquement chez *H. contortus* *glc-5* (232,313) et *glc-6* (18). Parmi les sous-unités identifiées, AVR-14A/B et GLC-4 semblent très conservées chez les nématodes car elles sont retrouvées dans des espèces de nématodes très différentes d'un point de vue phylogénétique, allant des espèces de nématodes de clade I aux nématodes de clade III et V (223). De plus, GLC-2 et GLC-3 ont été identifiées dans plusieurs espèces de nématodes de clade III (*Filarioidea* et *Ascaridoidea*) et V (*C. elegans*, *H. contortus*, *C. oncophora*). Ainsi AVR-14, GLC-2, GLC-3 et GLC-4 semblent former un cœur de sous-unités de GluCls retrouvés chez de nombreux nématodes d'intérêt médical. Une telle conservation de ces gènes chez les nématodes peut expliquer le large spectre d'activité des lactones macrocycliques sur les nématodes. Ainsi, ces sous-unités sont des candidates pertinentes pour étudier le mode d'action des MLs chez les nématodes parasites.

B. Récepteurs homomériques chez les nématodes de clade V

Toutes les sous-unités à l'exception de GLC-4 forment des récepteurs homomériques fonctionnels lorsqu'elles sont exprimées dans les œufs de xénope pour *C. elegans* (17,121,171,207,227). De plus, ces récepteurs sont tous sensibles à l'ivermectine à l'exception de GLC-2 (121,170,177). Chez *H. contortus* et *C. concophora*, un nombre plus restreint de récepteurs a été caractérisé au niveau fonctionnel. Cependant, chez ces deux espèces, AVR-14B (170,171,176,226) et GLC-2 (170,177) forment des récepteurs homomériques fonctionnels et seulement AVR-14B est sensible à l'ivermectine. Pour *H. contortus*, la sous-unité GLC-5 est également capable de former des récepteurs homomériques fonctionnelles sensibles à l'ivermectine (231,232,313). Les résultats obtenus pour les sous-unités conservées entre ces 3 espèces de clade V sont similaires. La fonctionnalité d'AVR-14A et de GLC-4 reste à ce jour inconnue et aucune étude fonctionnelle en œufs de xénope n'a été réalisée pour GLC-6 d'*H. contortus*.

Les résultats de cette thèse ont montré qu'à l'inverse des nématodes de clade V, les sous-unités de GluCl des nématodes de clade III (*B. malayi* et *P. univalens*) ne forment pas de récepteurs homomériques fonctionnels robustes (c'est-à-dire ne sont pas sensibles à une stimulation de glutamate ou produisent des petits courants de l'ordre du nA en utilisant des concentrations de glutamate de l'ordre du mM). Il y a tout de même l'exception de GLC-5 de *P. univalens* qui répond à des concentrations de glutamate de l'ordre du μ M en produisant de grands courants de l'ordre du μ A. Avec l'exception de GLC-5, de tels résultats posent la question de l'existence de tels récepteurs homériques *in vivo* et suggèrent que les sous-unités de nématodes de clade III doivent s'associer pour former des récepteurs hétéromériques fonctionnels robustes.

Au cours de cette thèse, l'hypothèse que GLC-2 pouvait s'associer aux autres sous-unités de GluCl s'appuyait sur sa capacité à s'associer à GLC-1 (121) et AVR-15 (233) chez *C. elegans* et avec AVR-14B chez *H. contortus* (177) et *C. onchophora* (170). Actuellement, tous les GluCls hétéromériques décrits incluent GLC-2 comme partenaire. Aussi, chez *C. elegans*, les sous-unités *avr-14*, *glc-2*, *glc-3* et *glc-4* sont exprimées dans les neurones du pharynx rendant possible leur rencontre *in vivo*. Par conséquent, nous avons étudié la possible interaction entre GLC-2 et les autres sous-unités en œufs de xénope chez les 3 espèces de nématodes *C. elegans*, *B. malayi* et *P. univalens*.

C. Un sous-type de GluCl très conservé chez les nématodes : AVR-14B/GLC-2

En œufs de xénope, la combinaison d'AVR-14B avec GLC-2 conduit à la formation de récepteurs au glutamate pour les trois espèces de nématodes étudiés *C. elegans*, *B. malayi* et *P. univalens* ainsi que chez *H. contortus* et *C. oncophora* (170,177). En effet, nous avons observé une forte diminution de l' EC_{50} du glutamate d'un facteur 4 à 23 pour la combinaison AVR-14B/GLC-2 par rapport à celles des mêmes sous-unités exprimées seules ; supportant l'association de ces deux sous-unités. Étonnamment, les EC_{50} glutamate que nous avons obtenues pour AVR-14B ($112,3 \pm 13 \mu M$) et GLC-2 ($214,6 \pm 13,1 \mu M$) de *C. elegans* étaient très basses par rapport à leur première description ($2200 \pm 120 \mu M$ pour AVR-14B et $1360 \pm 50 \mu M$ pour GLC-2) (121,171). Bien que nous ayons obtenu la même séquence protéique pour GLC-2 que celle précédemment décrite (121), celle d'AVR-14B différait d'un acide aminé positionné dans le 2^e domaine transmembranaire (Ser305) par rapport à celle identifiée par McCavera et al, (Thr 305) (171). En se basant sur les données obtenus par cristallographie de la sous-unité GLC-1 de *C. elegans*, on remarque que l'acide aminé correspondant est une sérine (Ser265) qui est impliquée dans la formation du pore du canal ionique (204). Cette différence d'acide aminé entre les deux séquences d'AVR-14B peut expliquer une telle différence entre les EC_{50} de glutamate.

L'application d'ivermectine et de moxidectine sur ce sous-type de GluCl chez *C. elegans*, *B. malayi* et *P. univalens* a montré sa sensibilité à ces deux molécules ce qui est en accord avec les études précédentes réalisées sur ce sous-type de GluCl chez *H. contortus* (177) et *C. oncophora* (170). Les MLs ont des propriétés pharmacologiques différentes avec des efficacités variables suivant l'espèce cible d'où leurs différences d'autorisations de commercialisation. En effet, l'ivermectine est la seule ML à être largement commercialisée pour une grande variété d'hôtes et de parasites tandis que, par exemple, l'évamectine est principalement utilisée pour lutter contre les poux de saumon en aquaculture (314). De plus, le maintien de l'efficacité de la moxidectine sur une souche de terrain d'*H. contortus* résistante à l'ivermectine (132) suggère que ces deux molécules ont soit des cibles préférentielles différentes soit des sites de fixation différents ce qui limiterait les phénomènes de cross-résistance. A ce jour, l'efficacité des MLs sur un même sous-type de GluCl n'a jamais été évaluée. L'application d'une large gamme de MLs (abamectine, doramectine, évamectine, éprinomectine, ivermectine, moxidectine et sélamectine) sur le sous-type de GluCl AVR-14B/GLC-2 a montré qu'elles étaient toutes efficaces pour activer ces récepteurs quelle que soit l'espèce de nématode. L'évamectine semble la ML la plus rapide d'action sur ce sous-type bien que cette différence ne soit pas significativement vérifiée avec toutes les autres MLs (notamment pour Pun-AVR-14B/GLC-2). Cette potentielle meilleure efficacité sur ce récepteur *in vitro* reste à être confirmée *in vivo*. Aussi, les différences d'efficacité des MLs *in vivo* ne peuvent pas être expliquées par les résultats obtenus sur ce sous-type car toutes les MLs sont efficaces pour activer ce sous type en œufs de xénope.

D. Nouveau sous-type de GluCl avec des propriétés pharmacologiques originales : GLC-2/GLC-3

De la même façon que pour AVR-14B/GLC-2, ce projet a permis la caractérisation d'un nouveau sous-type de GluCls composé de GLC-2 et de GLC-3. En effet, la combinaison de ces deux sous-unités en œufs de xénope a montré qu'elles étaient capables de s'associer pour *C. elegans* et *P. univalens* mais pas pour *B. malayi*. Pour confirmer que l'absence de réponse de GLC-2/GLC-3 de *B. malayi* suite à une stimulation avec du glutamate n'était pas due à un problème de fonctionnalité de la sous-unité GLC-3, cette sous-unité a été injectée en combinaison avec la sous-unité GLC-2 de *P. univalens*. Aucune de ces deux sous-unités n'étant capable de former de récepteur homomérique fonctionnel, la formation d'un récepteur chimérique fonctionnel sensible au glutamate a confirmé la fonctionnalité de Bma-GLC-3. Par conséquent, la formation d'un récepteur fonctionnel contenant Bma-GLC-3 ou Bma-GLC-2/GLC-3 pourrait potentiellement nécessiter l'addition d'une autre sous-unité ou l'addition de protéines auxiliaires comme c'est le cas pour certains nAChR (113,210).

Pour *C. elegans*, l'application d'ivermectine, de moxidectine et d'éprinomectine sur Cel-GLC-2/GLC-3 a montré qu'elles agissaient en tant qu'agonistes irréversibles tandis que sur Pun-GLC-2/GLC-3 aucune ML n'a montré cet effet. En revanche, l'ivermectine et la moxidectine ont potentialisé l'action du glutamate sur ce récepteur de façon réversible. A une concentration aussi élevée de MLs (1 μ M), cette propriété pharmacologique est rare chez les GluCls d'invertébrés car n'a été retrouvée que pour les sous-unités GLC-2 de *C. elegans* et d'*H. contortus* (121,177). Cela fait de ce nouveau sous-type une nouvelle cible pharmacologique originale ouvrant la voie au criblage de nouveaux composés et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour résumer, ces résultats montrent que : 1) AVR-14, GLC-2, GLC-3 et GLC-4 forment un groupe de sous-unités cœur chez une grande variété de nématodes, 2) l'association de sous-unité est nécessaire pour la formation de récepteurs fonctionnels chez les nématodes parasites de clade III *in vitro* en œufs de xénope, 3) GLC-2 a un rôle clef dans la composition de récepteurs hétéromériques en s'associant à AVR-14B chez *C. elegans*, *B. malayi*, *P. univalens*, *H. contortus* et *C. oncophora* et à GLC-3 chez *C. elegans* et *P. univalens* et 4) la faible différence de rapidité d'action des MLs sur ces nouveaux sous-types de GluCls n'expliquent pas la différence d'efficacité de ces MLs *in vivo*.

II. Une sous-unité rarement retrouvée chez les nématodes forme un récepteur sensible aux MLs : GLC-5

A. GLC-5 de *P. univalens* forme un récepteur homomérique fonctionnel sensible aux MLs

Chez *P. univalens*, la recherche dans les bases de données a permis d'identifier la sous-unité GLC-5 qui n'a pour l'instant été décrite que chez *H. contortus* (229–232). Cette sous-unité forme des récepteurs homomériques fonctionnels chez *H. contortus* et *P. univalens* avec des EC₅₀ les plus basses enregistrées pour des GluCl_s de nématodes avec 8 µM (231) et 5 µM respectivement. Une telle sensibilité au glutamate *in vitro* en œuf de xénope peut également être similaire *in vivo* suggérant un rôle très important de GLC-5 dans la médiation de la neurotransmission. En effet, il a été montré que l'expression de Hco-AVR-14B dans un triple mutant de *C. elegans* résistant à l'ivermectine restaure la sensibilité du ver à l'ivermectine mais augmente également la fréquence de réversion (fréquence à laquelle le vers inverse son mouvement) (18,208). Ce phénomène peut être expliqué par la plus grande sensibilité de Hco-AVR-14B (28 µM) par rapport à Cel-AVR-14B (112 à 2200 µM) observée *in vitro* (171).

L'application d'une large gamme de MLs sur ce récepteur a montré qu'elles agissaient toutes comme des agonistes irréversibles. Il est intéressant de noter que l'ivermectine et la moxidectine présentent une plus grande rapidité d'action que les autres MLs pour activer ce récepteur. A ce jour, les deux seules MLs autorisées en France pour le traitement des chevaux sont l'ivermectine et la moxidectine (ANSES – Index des médicaments vétérinaires autorisés en France). Ces résultats suggèrent que Pun-GLC-5 est une cible majeure de ces traitements et peuvent expliquer pourquoi ces deux MLs sont celles utilisées pour lutter contre les infestations à *Parascaris sp.*

B. Localisation de *Pun-glc-5*

L'hypothèse que GLC-5 est un récepteur très important pour la médiation de la neurotransmission est également soutenue par la large distribution de *glc-5* dans le nématode. En effet, l'expression du promoteur de *glc-5* de *P. univalens* contrôlant l'expression de la GFP dans des jeunes adultes de *C. elegans*, a permis de voir que cette sous-unité est exprimée dans des neurones de la tête et autour du pharynx, dans la vulve et dans la queue. Cependant, GLC-5 n'a pas de sous-unité homologue chez *C. elegans* et sa localisation d'expression chez *P. univalens* peut être différente *in vivo* et reste à être déterminée directement chez le parasite. Cependant, des expériences d'immunofluorescence en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre GLC-5 d'*H. contortus* ont montré des localisations d'expression similaires dans les commissures des neurones moteurs inhibiteurs allant de la partie antérieure du vers sous le pharynx jusqu'à la partie antérieure de la vulve (237). Malgré cela, chez *H. contortus*, aucune expression n'a été observée dans la vulve et dans la queue comme c'est le cas pour *P. univalens*.

Avec une telle localisation, nous pouvons supposer que GLC-5 peut avoir un rôle dans la locomotion, dans des fonctions pharyngales et dans la ponte des œufs.

C. Fonction de *Pun-GLC-5*

Pour confirmer le rôle de *Pun-GLC-5* dans la locomotion et pour vérifier que cette sous-unité est bien ciblée par l'ivermectine *in vivo*, une construction contenant son promoteur (validé par les expériences de localisations précédentes) et sa séquence codante a été injectée dans des jeunes adultes quadruples mutants (*avr-14*, *avr-15*, *glc-1* et *glc-3*) de *C. elegans* résistants à l'ivermectine (souche JD369). Des tests de mobilité sur deux lignées recombinantes ont montré que la mise en contact avec de l'ivermectine à 150 nM rétablissait un niveau de sensibilité à l'ivermectine égal à celui de la souche sauvage N2 ; tandis que cette concentration n'avait pas d'effet sur le quadruple mutant JD369. Ces résultats confirment que GLC-5 est bien une cible de l'ivermectine *in vivo* et supportent l'implication de GLC-5 dans des fonctions de locomotion.

L'hypothèse que GLC-5 peut être impliquée dans des fonctions pharyngales et dans la ponte, supportée par sa localisation d'expression, reste encore à être confirmée. N'ayant pas pu obtenir de lignées recombinantes stables, les tests de ponte et de développement larvaire précédemment mis au point (18) représentent un certain challenge mais peuvent être envisagés par la suite. De même, des analyses de la fréquence de pompage du pharynx par des mesures visuelles et/ou des mesures d'électrophysiologie pourront confirmer ou non l'implication de GLC-5 dans ces processus pharyngaux (301,302).

Ensemble, ces résultats montrent que GLC-5 est une cible pharmacologique très intéressante pour le criblage de nouvelles molécules nécessaire pour le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les nématodes parasites.

III. Caractérisation de cibles pharmacologiques du pou de corps humain *Pediculus humanus humanus*

A. Première caractérisation fonctionnelle de LGICs de poux humains

Malgré le fort impact social et économique que représentent les poux (70–72,101), le travail de cette thèse a permis l'identification et la caractérisation fonctionnelle des deux premiers LGICs du poux de corps humain *Pediculus humanus humanus*. Le glutamate et le GABA sont deux neurotransmetteurs inhibiteurs importants du système nerveux des invertébrés et il a été montré chez plusieurs espèces d'insectes (parasites ou bénéfiques) que les GluCl et les récepteurs au GABA sont les cibles pharmacologiques majeures de nombreux insecticides (ivermectine, fipronil, dieldrine, lindane etc...) (115,272). Par conséquent, ce travail de thèse s'est focalisé sur l'identification de ces récepteurs et a permis la caractérisation du récepteur au glutamate Phh-GluCl et du récepteur au GABA Phh-RDL qui forment tous les deux des récepteurs homomériques fonctionnels quand ils sont exprimés en œufs de xénope.

Pour chaque sous-unité, deux séquences ont été identifiées pouvant correspondre soit à des transcrits alternatifs soit être issu de A-to-I editing (251). Ces deux mécanismes sont connus pour augmenter la diversité des sous-unités de LGICs chez les insectes dont certains variants ont des fonctions différentes dans la sensibilité aux insecticides ou dans certains processus physiologiques (211,219–221). Par conséquent, il est envisageable qu'en plus des deux séquences de GluCl et des deux séquences de RDL identifiées, d'autres variants de GluCl et de RDL soient exprimés chez le pou mais de nouvelles recherches aux niveaux de l'ADN et de l'ARN sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. De plus, nous avons montré qu'un des deux variants identifiés ne formait pas de récepteur homomérique fonctionnel en œufs de xénope. Cependant, il est possible que ce variant s'associe à d'autres sous-unités pour moduler leurs expressions ou leurs fonctions *in vivo*. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'association des deux variants de GluCl (Phh-GluCl-1 et Phh-GluCl-2) ou de RDL (Phh-RDL-1 et Phh-RDL-2) peut changer les propriétés pharmacologiques des récepteurs, ce qui pourra être étudié par électrophysiologie en œufs de xénope.

Ces travaux ouvrent la voie à l'identification et à la caractérisation de nouveaux LGICs qui sont autant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

B. Mode d'action des lactones macrocycliques sur les insectes

Bien que l'ivermectine soit devenue une molécule de référence en tant que pédiculicide contre les poux de corps (97,101), ses cibles pharmacologiques n'étaient pas encore caractérisées au début de ce travail de thèse. Par rapport aux autres pédiculicides à base de silicone ou insecticides, l'ivermectine présente de nombreux avantages pour son utilisation contre les poux de corps. En effet, certains pédiculicides insecticides tels que le lindane ou le malathion sont aujourd'hui interdits ou déconseillés à cause de leur toxicité et de leur impact environnemental (90–94). A l'inverse, l'ivermectine est une molécule reconnue comme n'ayant qu'une très faible toxicité pour les mammifères d'où sa forte utilisation en médecine humaine et vétérinaire (315). De plus, les poux de corps vivant dans les vêtements, les produits étouffeurs à base de silicone ne peuvent pas être appliqués et l'ivermectine est la seule molécule pédiculicide à prise orale. Ce mode d'administration présente également l'avantage d'éviter les sous-dosages dus à la mauvaise application de shampoing, réduisant ainsi l'émergence de poux résistants (100,316,317), et permettant de traiter les personnes les plus à risque n'ayant qu'un accès limité aux services d'hygiène de base.

Les résultats de cette thèse ont permis de confirmer l'efficacité de l'ivermectine *in vivo* sur les poux de corps et d'identifier le récepteur Phh-GluCl comme étant sa cible préférentielle par rapport au récepteur au GABA Phh-RDL. L'utilisation d'ARN interférence pour bloquer des fonctions *in vivo* a été mis au point pour étudier le rôle de gène de détoxification dans la tolérance à l'ivermectine par les poux de corps (141). Cette approche pourrait être envisagée pour confirmer que le GluCl identifié est bien la cible préférentielle de l'ivermectine chez les poux et permettrait d'étudier la fonction de ce récepteur *in vivo* comme cela a été fait pour l'abamectine chez *T. cinnabarinus* (250) et *Bemisia tabaci* (318).

C. Isoxazolines : futur pédiculicides

Les isoxazolines sont une nouvelle famille de molécules aux propriétés insecticides et acaricides dont les cibles moléculaires sont principalement les récepteurs RDL (187,198,246,249,289,319,320) et secondairement les GluCls (198,246,249) chez les arthropodes, suggérant une efficacité potentielle sur les poux. L'application de lotilaner sur les récepteurs GluCl et RDL de poux a montré que cette molécule bloquait sélectivement et efficacement le récepteur RDL. Parmi les autres isoxazolines, le fluralaner a montré un effet antagoniste sur les récepteurs RDL de *M. domestica* et *R. microplus* mais a également montré son activité antagoniste sur les GluCls (198,246,249). Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si ces différences sont dues aux composés eux-mêmes ou si cela est dû aux propriétés pharmacologiques des récepteurs. Cependant, pour confirmer que RDL est bien la cible sélective du lotilaner, le *silencing* de son gène chez le poux de corps par des expériences d'ARN interférence pourrait être envisagé (141,250).

Les tests de toxicité réalisés sur les poux de corps ont montré que le lotilaner a un effet pédiculicide plus important et plus rapide que l'ivermectine sur les adultes. Sa rapidité d'action ainsi que son activité sur les adultes mais pas sur les lentes est en accord avec ce qui est connu de ses effets chez le chien pour traiter les puces et les tiques (321,322). En effet, le lotilaner tue les puces et les tiques en 4 h alors que nous observons 100 % d'efficacité sur les poux en 3 h. De plus, bien qu'il ne soit pas actif sur les lentes, le lotilaner reste efficace pendant 1 mois chez le chien (187,307,321,322) permettant à une prise orale unique de médicament de totalement contrôler l'infestation. Le cycle de vie du pou de corps étant d'environ 17 jours (74,77), il est possible de spéculer qu'une seule prise orale puissent également contrôler une infestation de poux chez l'Homme. De plus, bien que l'effet des isoxazolines restent à déterminer chez l'Homme, cette famille de molécules présente une faible toxicité sur les mammifères (187,198,249) grâce à ses cibles préférentielles uniquement retrouvées chez les arthropodes. Il est également intéressant de noter que les résistances aux isoxazolines n'ont pas encore été rapportées et que d'autres insecticides tels que le fipronil ou la dieldrine ne semblent pas pouvoir conférer de résistances croisées. En effet, il a été montré que le fluralaner et le lotilaner gardent leurs effets antagonistes sur les récepteurs RDL possédant des mutations connues de résistance au fipronil et à la dieldrine chez *M. domestica* (198) et *D. melanogaster* (187). Chez *M. domestica*, cette absence de résistances croisées entre le fipronil/dieldrine et le fluralaner/lotilaner a été confirmée *in vivo* (198). De par leur efficacité contre les ectoparasites (185) en prise orale et leur faible toxicité pour les mammifères, les isoxazolines semblent être de bons candidats comme nouveaux pédiculicides chez l'Homme.

IV. Résistance aux lactones macrocycliques chez les invertébrés

A. Etude de l'impact des mutations point *in vitro*

La résistance aux lactones macrocycliques est multifactorielle. Chez les invertébrés, il a été montré que les GluCls peuvent être impliqués dans la résistance aux MLs à cause de mutations points (SNPs : single nucleotide polymorphisms) (17,104,105,154,170–177) ou de diminution de leur taux d'expression (154,178)

Chez le pou humain, il a été observé des mutations points sur le GluCl d'une souche résistante de poux de tête (104). La caractérisation de ce récepteur (Phh-GluCl) au cours de cette thèse fournit un outil précieux pour l'exploration des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux MLs. Par électrophysiologie en œufs de xénope, il serait intéressant de déterminer la fonctionnalité de chaque SNPs identifiés pour confirmer leur implication dans la résistance comme cela a été fait chez d'autres espèces (148,149,323). De plus, l'expression de GluCls insensibles ou moins sensibles aux MLs en œufs de xénope ou en lignées cellulaires seraient de puissants outils pour le criblage et le développement de nouveaux composés aux propriétés antiparasitaires n'ayant pas de résistances croisées avec les MLs.

Ce même procédé peut également être transposé pour les GluCls de nématodes tels que GLC-5 pour le développement de nouveaux anthelminthiques plus spécifiques de certains nématodes ; ou sur GLC-2/GLC-3 de *P. univalens* qui n'est que faiblement impacté par les MLs et est une cible « vierge » pour le développement de nouveaux antiparasitaires.

B. Etude de l'impact des mutations point *in vivo*

La transformation ou la modification génétique de nématodes parasites restent un challenge pour de nombreuses espèces (324,325). Récemment, des expériences d'ARN interférence représentent une alternative pour l'étude des cibles moléculaires des MLs. Cette méthode a notamment été développée chez *B. malayi* pour invalider l'expression de nAChR (326) et de la sous-unité SLO-1 (327). Couplée à l'utilisation de *C. elegans* comme système d'expression hétérologue pour effectuer des tests phénotypiques (328), cette approche représente une bonne alternative pour évaluer la contribution des différents sous-types de GluCls dans la sensibilité aux MLs *in vivo* (212). En effet, les GluCls sont exprimés dans différents tissus chez les invertébrés et ont différentes fonctions physiologiques ce qui pourrait expliquer les différents effets des lactones macrocycliques tels que l'inhibition de la mobilité (122), l'inhibition du pompage du pharynx (122), l'induction de la stérilité chez les nématodes femelles (133,235) ainsi que leur impact sur les interactions hôte-parasite (133,234). Dans ce sens, *C. elegans* est un formidable outil pour la modification génétique et pour les tests phénotypiques variés pouvant être réalisés sur ce modèle.

CONCLUSION

Ce projet de thèse apporte une meilleure compréhension du mode d'action des lactones macrocycliques sur leurs cibles moléculaires chez les invertébrés. Ce projet a permis d'identifier et de caractériser aux niveaux moléculaire et fonctionnel les premiers GluClS de *B. malayi* et de *P. univalens*. De nouveaux sous-types de GluClS ont été caractérisés chez les nématodes parasites *B. malayi* et *P. univalens* mais également chez le nématode modèle *C. elegans*. Chez *C. elegans*, les sous-unités de GluClS sont pour la plupart capables de former des récepteurs homomériques (AVR-14B, AVR-15A/B, GLC-1, GLC-2, GLC-3) mais ont également la capacité de s'associer pour former des récepteurs hétéromériques (AVR-14B/GLC-2, AVR-15B/GLC-2, GLC-1/GLC-2, GLC-2/GLC-3). A l'inverse, les nématodes parasites du clade III (*B. malayi*, *P. univalens*) forment surtout des récepteurs hétéromériques dont GLC-2 semble être la sous-unité clef pour leur formation. Chez *P. univalens*, le récepteur GLC-2/GLC-3 présente des propriétés pharmacologiques originales pour un GluCl car les MLs n'ont pas d'effet agoniste sur celui-ci. Aussi, GLC-5 est une sous-unité rare chez les nématodes et qui est capable de former des récepteurs homomériques fonctionnels largement exprimés dans le ver suggérant une implication fonctionnelle dans différents processus physiologiques (mobilité, pompage du pharynx, ponte des œufs...). Néanmoins, ces travaux montrent la grande complexité des GluClS et montrent qu'il reste encore beaucoup à découvrir sur les GluClS en termes de composition en sous-unité, de propriétés pharmacologiques et de fonctions physiologiques. De même, l'importance de chaque sous-type de GluCl dans la sensibilité aux différentes MLs *in vivo* reste à être déterminée.

Ce projet a permis d'identifier les premiers LGICs du pou de corps humain *Pediculus humanus humanus* et de déterminer le mode d'action de l'ivermectine (MLs) et du lotilaner (isoxazoline) *in vitro* et *in vivo*. L'ivermectine agit préférentiellement sur le récepteur GluCl mais présente également un effet antagoniste sur le récepteur au GABA RDL tandis que le lotilaner ne cible que RDL. L'efficacité du lotilaner pour tuer les poux adultes, sa longue durée d'efficacité et sa faible toxicité pour les mammifères en font un bon candidat comme nouveau traitement pédiculicide.

Ce projet a permis d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques chez des nématodes et des insectes ayant un impact important en médecine humaine et vétérinaire. Ces travaux permettront la génération d'outils nécessaires au criblage de molécules pour le développement de nouvelles stratégies de lutte contre le parasitisme, et permettront également la caractérisation de mutations potentiellement impliquées dans la résistance aux antiparasitaires.

REFERENCES

1. Giribet G. Zoology: Invertebrates that Parasitize Invertebrates. *Curr Biol*. 2016 Jul;26(13):R537–9.
2. Blaxter M, Koutsovoulos G. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*. 2015 Feb;142(S1):S26–39.
3. Hugot J-P, Baujard P, Morand S. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*. 2001;3(3):199–208.
4. Dobson A, Lafferty KD, Kuris AM, Hechinger RF, Jetz W. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Aug 12;105(Supplement 1):11482–9.
5. Blaxter M, Denver DR. The worm in the world and the world in the worm. *BMC Biol*. 2012 Dec;10(1):57.
6. Nematodes and their role in the meiobenthos [Internet]. [cited 2020 Apr 3]. Available from: <https://library.si.edu/digital-library/book/nematodestheirro00plat>
7. Franks CJ, Holden-Dye L, Bull K, Luedtke S, Walker RJ. Anatomy, physiology and pharmacology of *Caenorhabditis elegans* pharynx: a model to define gene function in a simple neural system. *Invertebr Neurosci*. 2006 Sep;6(3):105–22.
8. Altun, Z.F., Herndon, L.A., Wolkow, C.A., Crocker, C., Lints, R. and Hall, D.H. WormAtlas [Internet]. (ed.s) 2002-2020.; Available from: <http://www.wormatlas.org>
9. Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, et al. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*. 1997 May 29;387(6632):489–93.
10. 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 Mar 5;392(6671):71–5.
11. C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2012–8.
12. Stein LD, Bao Z, Blasiar D, Blumenthal T, Brent MR, Chen N, et al. The Genome Sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A Platform for Comparative Genomics. Jonathan A. Eisen, editor. *PLoS Biol*. 2003 Nov 17;1(2):e45.
13. Nigon VM, Félix M-A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook Online Rev C Elegans Biol*. 2017 07;2017:1–84.
14. Andersen EC, Gerke JP, Shapiro JA, Crissman JR, Ghosh R, Bloom JS, et al. Chromosome-scale selective sweeps shape *Caenorhabditis elegans* genomic diversity. *Nat Genet*. 2012 Mar;44(3):285–90.
15. Barrière A, Félix M-A. Natural variation and population genetics of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook Online Rev C Elegans Biol*. 2005 Dec 26;1–19.
16. Sepúlveda-Crespo D, Reguera RM, Rojo-Vázquez F, Balaña-Fouce R, Martínez-Valladares M. Drug discovery technologies: *Caenorhabditis elegans* as a model for anthelmintic therapeutics. *Med Res Rev*. 2020 Mar 13;
17. Dent JA, Smith MM, Vassilatis DK, Avery L. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2674–9.
18. Glendinning SK, Buckingham SD, Sattelle DB, Wonnacott S, Wolstenholme AJ. Glutamate-Gated Chloride Channels of *Haemonchus contortus* Restore Drug Sensitivity to Ivermectin Resistant *Caenorhabditis elegans*. Carlow CKS, editor. *PLoS ONE*. 2011 Jul 26;6(7):e22390.

19. Hahnel SR, Dilks CM, Heisler I, Andersen EC, Kulke D. *Caenorhabditis elegans* in anthelmintic research – Old model, new perspectives. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2020 Oct;S2211320720300312.
20. Oerke E-C. Crop losses to pests. *J Agric Sci*. 2006 Feb;144(1):31–43.
21. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2016. *Releve Epidemiol Hebd*. 2017 06;92(40):594–607.
22. Sabesan S, Kumar NP, Krishnamoorthy K, Panicker KN. Seasonal abundance & biting behaviour of *Mansonia annulifera*, *M. uniformis* & *M. indiana* & their relative role in the transmission of malayan filariasis in Shertallai (Kerala state). *Indian J Med Res*. 1991 Jul;93:253–8.
23. Paily KP, Hoti SL, Das PK. A review of the complexity of biology of lymphatic filarial parasites. *J Parasit Dis Off Organ Indian Soc Parasitol*. 2009 Dec;33(1–2):3–12.
24. Remme JHF, Feenstra P, Lever PR, Medici AC, Morel CM, Noma M, et al. Tropical Diseases Targeted for Elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis, and Leprosy. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, et al., editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries* [Internet]. 2nd ed. Washington (DC): World Bank; 2006 [cited 2020 Mar 31]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11745/>
25. Buckley JJ. On *Brugia* gen. nov. for *Wuchereria* spp. of the “malayi” group, i.e., *W. malayi* (Brug, 1927), *W. pahangi* Buckley and Edeson, 1956, and *W. patei* Buckley, Nelson and Heisch, 1958. *Ann Trop Med Parasitol*. 1960 Apr;54:75–7.
26. David HL, Edeson JFB. Filariasis in Portuguese Timor, with observations on a new microfilaria found in man. *Ann Trop Med Parasitol*. 1965 Jun;59(2):193–204.
27. Rao SS. Records of Findings of Adult *Wuchereria* (Filaria) Bancrofti in India. *Indian Med Gaz*. 1930 Sep;65(9):481–3.
28. Hairston NG, de Meillon B. On the inefficiency of transmission of *Wuchereria bancrofti* from mosquito to human host. *Bull World Health Organ*. 1968;38(6):935–41.
29. Kar SK, Dwibedi B, Das BK, Agrawala BK, Ramachandran CP, Horton J. Lymphatic pathology in asymptomatic and symptomatic children with *Wuchereria bancrofti* infection in children from Odisha, India and its reversal with DEC and albendazole treatment. Hübner MP, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Oct 23;11(10):e0005631.
30. Dreyer G, Norões J, Figueredo-Silva J, Piessens WF. Pathogenesis of lymphatic disease in bancroftian filariasis: a clinical perspective. *Parasitol Today Pers Ed*. 2000 Dec;16(12):544–8.
31. Cano J, Rebollo MP, Golding N, Pullan RL, Crellen T, Soler A, et al. The global distribution and transmission limits of lymphatic filariasis: past and present. *Parasit Vectors*. 2014 Dec;7(1):466.
32. Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2018. *Wkly Epidemiol Rec*. 2019 10;94(41):457–70.
33. Rojanaparnus S, Tothong T, Boondej P, Thammapalo S, Khuanyoung N, Santabutr W, et al. How Thailand eliminated lymphatic filariasis as a public health problem. *Infect Dis Poverty*. 2019 May 27;8(1):38.
34. Ramaiah KD, Ottesen EA. Progress and impact of 13 years of the global programme to eliminate lymphatic filariasis on reducing the burden of filarial disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Nov;8(11):e3319.
35. Turner HC, Bettis AA, Chu BK, McFarland DA, Hooper PJ, Ottesen EA, et al. The health and economic benefits of the global programme to eliminate lymphatic filariasis (2000–2014). *Infect Dis Poverty*. 2016 Dec;5(1):54.
36. Fischer PU, King CL, Jacobson JA, Weil GJ. Potential Value of Triple Drug Therapy with Ivermectin, Diethylcarbamazine, and Albendazole (IDA) to Accelerate Elimination of Lymphatic Filariasis and Onchocerciasis in Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005163.

37. Bockarie MJ, Pedersen EM, White GB, Michael E. Role of vector control in the global program to eliminate lymphatic filariasis. *Annu Rev Entomol.* 2009;54:469–87.
38. Rebollo MP, Bockarie MJ. Can Lymphatic Filariasis Be Eliminated by 2020? *Trends Parasitol.* 2017;33(2):83–92.
39. Pi-Bansa S, Osei JHN, Frempong KK, Elhassan E, Akuoko OK, Agyemang D, et al. Potential factors influencing lymphatic filariasis transmission in “hotspot” and “control” areas in Ghana: the importance of vectors. *Infect Dis Poverty.* 2019 Feb 5;8(1):9.
40. Peng Z, Shen D, Zhang D, Li X, Wang L, Zhai Q, et al. Genetic characteristics and phylogenetic relationship of *Parascaris* spp. from *Equus zebra*, *E. caballus*, and *E. asinus*. *Vet Parasitol.* 2019 Jul;271:76–9.
41. Nielsen MK, Wang J, Davis R, Bellaw JL, Lyons ET, Lear TL, et al. *Parascaris univalens*--a victim of large-scale misidentification? *Parasitol Res.* 2014 Dec;113(12):4485–90.
42. Gao JF, Zhang XX, Wang XX, Li Q, Li Y, Xu WW, et al. According to mitochondrial DNA evidence, *Parascaris equorum* and *Parascaris univalens* may represent the same species. *J Helminthol.* 2018 May 24;1–6.
43. Laugier C, Sevin C, Ménard S, Maillard K. Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France. *Vet Parasitol.* 2012 Aug;188(1–2):185–9.
44. Lacaille C. *Parascaris equorum* : un vieux ver toujours d’actualité. Thèse d’exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 204 p. [Toulouse]: Paul-Sabatier de Toulouse; 2014.
45. Brown PJ, Clayton HM. Hepatic pathology of experimental *Parascaris equorum* infection in worm-free foals. *J Comp Pathol.* 1979 Jan;89(1):115–23.
46. Nicholls JM, Clayton HM, Pirie HM, Duncan JL. A pathological study of the lungs of foals infected experimentally with *Parascaris equorum*. *J Comp Pathol.* 1978 Apr;88(2):261–74.
47. Clayton HM, Duncan JL. The migration and development of *Parascaris equorum* in the horse. *Int J Parasitol.* 1979 Aug;9(4):285–92.
48. Reinemeyer CR, Nielsen MK. Parasitism and colic. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2009 Aug;25(2):233–45.
49. Concetti A, Fioretti E, Barra D, Ascoli F. Protease inhibitors from the parasitic worm *Parascaris equorum*. *Eur J Biochem.* 1984 Dec 3;145(2):417–21.
50. Burk SV, Dangoudoubiyam S, Brewster-Barnes T, Bryant UK, Howe DK, Carter CN, et al. In vitro culture of *Parascaris equorum* larvae and initial investigation of parasite excretory-secretory products. *Parasitol Res.* 2014 Nov;113(11):4217–24.
51. Tatz AJ, Segev G, Steinman A, Berlin D, Milgram J, Kelmer G. Surgical treatment for acute small intestinal obstruction caused by *Parascaris equorum* infection in 15 horses (2002–2011). *Equine Vet J Suppl.* 2012 Dec;(43):111–4.
52. Cribb NC, Cote NM, Bouré LP, Peregrine AS. Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985–2004). *N Z Vet J.* 2006 Dec;54(6):338–43.
53. Morsy K, Bashtar AR, Al Quraishy S, Adel S. Description of two equine nematodes, *Parascaris equorum* Goeze 1782 and *Habronema microstoma* Schneider 1866 from the domestic horse *Equus ferus caballus* (Family: Equidae) in Egypt. *Parasitol Res.* 2016 Nov;115(11):4299–306.
54. Coop RL, Holmes PH. Nutrition and parasite interaction. *Int J Parasitol.* 1996 Sep;26(8–9):951–62.
55. Koudela B, Bodeček Š. Effects of low and high temperatures on viability of *Parascaris equorum* eggs suspended in water. *Vet Parasitol.* 2006 Nov;142(1–2):123–8.
56. Gould JC, Rossano MG, Lawrence LM, Burk SV, Ennis RB, Lyons ET. The effects of windrow composting on the viability of *Parascaris equorum* eggs. *Vet Parasitol.* 2013 Jan 16;191(1–2):73–80.

57. Forteau L, Dumont B, Sallé G, Bigot G, Fleurance G. Horses grazing with cattle have reduced strongyle egg count due to the dilution effect and increased reliance on macrocyclic lactones in mixed farms. *Anim Int J Anim Biosci*. 2019 Nov 4;1–7.
58. Becher AM, van Doorn DC, Pfister K, Kaplan RM, Reist M, Nielsen MK. Equine parasite control and the role of national legislation - A multinational questionnaire survey. *Vet Parasitol*. 2018 Aug 15;259:6–12.
59. Saeed MA, Beveridge I, Abbas G, Beasley A, Bauquier J, Wilkes E, et al. Systematic review of gastrointestinal nematodes of horses from Australia. *Parasit Vectors*. 2019 Apr 29;12(1):188.
60. Nielsen MK. Universal challenges for parasite control: a perspective from equine parasitology. *Trends Parasitol*. 2015 Jul;31(7):282–4.
61. Scare JA, Steuer AE, Gravatte HS, Kálmán C, Ramires L, Dias de Castro LL, et al. Management practices associated with strongylid parasite prevalence on horse farms in rural counties of Kentucky. *Vet Parasitol Reg Stud Rep*. 2018;14:25–31.
62. Cain JL, Foulk D, Jedrzejewski E, Stofanek H, Nielsen MK. The importance of anthelmintic efficacy monitoring: results of an outreach effort. *Parasitol Res*. 2019 Aug 17;
63. Beutel R. *Insect morphology and phylogeny: a textbook for students of entomology*. Berlin ; New York: De Gruyter; 2013. 516 p. (De Gruyter graduate).
64. Boutellis A, Abi-Rached L, Raoult D. The origin and distribution of human lice in the world. *Infect Genet Evol*. 2014 Apr;23:209–17.
65. Falagas ME, Matthaïou DK, Rafailidis PI, Panos G, Pappas G. Worldwide Prevalence of Head Lice. *Emerg Infect Dis*. 2008 Sep;14(9):1493–4.
66. Ascunce MS, Troups MA, Kassu G, Fane J, Scholl K, Reed DL. Nuclear Genetic Diversity in Human Lice (*Pediculus humanus*) Reveals Continental Differences and High Inbreeding among Worldwide Populations. Dale C, editor. *PLoS ONE*. 2013 Feb 27;8(2):e57619.
67. Al-Shahrani SA, Alajmi RA, Ayaad TH, Al-Shahrani MA, Shaurub E-SH. Genetic diversity of the human head lice, *Pediculus humanus capitis*, among primary school girls in Saudi Arabia, with reference to their prevalence. *Parasitol Res*. 2017 Oct;116(10):2637–43.
68. Liao C-W, Cheng P-C, Chuang T-W, Chiu K-C, Chiang I-C, Kuo J-H, et al. Prevalence of *Pediculus capitis* in schoolchildren in Battambang, Cambodia. *J Microbiol Immunol Infect [Internet]*. 2017 Oct [cited 2018 Jul 16]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1684118217302293>
69. Louni M, Mana N, Bitam I, Dahmani M, Parola P, Fenollar F, et al. Body lice of homeless people reveal the presence of several emerging bacterial pathogens in northern Algeria. Vinetz JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Apr 17;12(4):e0006397.
70. Ly TDA, Touré Y, Calloix C, Badiaga S, Raoult D, Tissot-Dupont H, et al. Changing Demographics and Prevalence of Body Lice among Homeless Persons, Marseille, France. *Emerg Infect Dis*. 2017 Nov;23(11):1894–7.
71. Badiaga S, Brouqui P. Human louse-transmitted infectious diseases. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Apr;18(4):332–7.
72. Brouqui P. Arthropod-Borne Diseases Associated with Political and Social Disorder. *Annu Rev Entomol*. 2011 Jan 7;56(1):357–74.
73. Bonilla DL, Durden LA, Ereemeeva ME, Dasch GA. The Biology and Taxonomy of Head and Body Lice—Implications for Louse-Borne Disease Prevention. Heitman J, editor. *PLoS Pathog*. 2013 Nov 14;9(11):e1003724.
74. Veracx A, Raoult D. Biology and genetics of human head and body lice. *Trends Parasitol*. 2012 Dec;28(12):563–71.

75. Kirkness EF, Haas BJ, Sun W, Braig HR, Perotti MA, Clark JM, et al. Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Jul 6;107(27):12168–73.
76. Olds BP, Coates BS, Steele LD, Sun W, Agunbiade TA, Yoon KS, et al. Comparison of the transcriptional profiles of head and body lice. *Insect Mol Biol*. 2012 Apr;21(2):257–68.
77. Lebwohl M, Clark L, Levitt J. Therapy for Head Lice Based on Life Cycle, Resistance, and Safety Considerations. *PEDIATRICS*. 2007 May 1;119(5):965–74.
78. Mumcuoglu KY, Klaus S, Kafka D, Teiler M, Miller J. Clinical observations related to head lice infestation. *J Am Acad Dermatol*. 1991 Aug;25(2):248–51.
79. Mumcuoglu KY, Friger M, Ioffe-Uspensky I, Ben-Ishai F, Miller J. Louse comb versus direct visual examination for the diagnosis of head louse infestations. *Pediatr Dermatol*. 2001 Feb;18(1):9–12.
80. Feldmeier H. Treatment of Pediculosis Capitis: A Critical Appraisal of the Current Literature. *Am J Clin Dermatol*. 2014 Oct;15(5):401–12.
81. Combescot-Lang C, Vander Stichele RH, Toubate B, Veirron E, Mumcuoglu KY. Ex vivo effectiveness of French over-the-counter products against head lice (*Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778). *Parasitol Res*. 2015 May;114(5):1779–92.
82. Izri A, Uzzan B, Maigret M, Gordon MS, Bouges-Michel C. Clinical efficacy and safety in head lice infection by *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) of a capillary spray containing a silicon-oil complex. *Parasite Paris Fr*. 2010 Dec;17(4):329–35.
83. Burgess IF, Silverston P. Head lice. *BMJ Clin Evid*. 2015 Jan 14;2015.
84. Burgess IF, Brunton ER, Burgess NA. Single application of 4% dimeticone liquid gel versus two applications of 1% permethrin creme rinse for treatment of head louse infestation: a randomised controlled trial. *BMC Dermatol*. 2013 Dec;13(1):5.
85. Meinking TL, Villar ME, Vicaria M, Eyerdam DH, Paquet D, Mertz-Rivera K, et al. The Clinical Trials Supporting Benzyl Alcohol Lotion 5% (Ulesfia[™]): A Safe and Effective Topical Treatment for Head Lice (*Pediculosis Humanus Capitis*). *Pediatr Dermatol*. 2010 Jan;27(1):19–24.
86. Clark JM, Yoon KS, Lee SH, Pittendrigh BR. Human lice: Past, present and future control. *Pestic Biochem Physiol*. 2013 Jul;106(3):162–71.
87. Downs AM, Stafford KA, Harvey I, Coles GC. Evidence for double resistance to permethrin and malathion in head lice. *Br J Dermatol*. 1999 Sep;141(3):508–11.
88. Durand R, Bouvresse S, Berdjane Z, Izri A, Chosidow O, Clark JM. Insecticide resistance in head lice: clinical, parasitological and genetic aspects. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Apr;18(4):338–44.
89. Kwon DH, Kim JH, Kim YH, Yoon KS, Clark JM, Lee SH. Identification and characterization of an esterase involved in malathion resistance in the head louse *Pediculus humanus capitis*. *Pestic Biochem Physiol*. 2014 Jun;112:13–8.
90. Idriss S, Levitt J. Malathion for head lice and scabies: treatment and safety considerations. *J Drugs Dermatol JDD*. 2009 Aug;8(8):715–20.
91. Eisenhower C, Farrington EA. Advancements in the treatment of head lice in pediatrics. *J Pediatr Health Care Off Publ Natl Assoc Pediatr Nurse Assoc Pract*. 2012 Dec;26(6):451–461–464.
92. Nolan K, Kamrath J, Levitt J. Lindane toxicity: a comprehensive review of the medical literature. *Pediatr Dermatol*. 2012 Apr;29(2):141–6.

93. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol*. 2015 May;16(5):490–1.
94. Richardson JR, Taylor MM, Shalat SL, Guillot TS, Caudle WM, Hossain MM, et al. Developmental pesticide exposure reproduces features of attention deficit hyperactivity disorder. *FASEB J*. 2015 May;29(5):1960–72.
95. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides [Internet]. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2017 [cited 2020 Jan 21]. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436774/>
96. Diamantis SA, Morrell DS, Burkhart CN. Treatment of head lice. *Dermatol Ther*. 2009 Aug;22(4):273–8.
97. Frankowski BL. American Academy of Pediatrics guidelines for the prevention and treatment of head lice infestation. *Am J Manag Care*. 2004 Sep;10(9 Suppl):S269-272.
98. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol*. 2017 Jun;33(6):463–72.
99. Strycharz JP, Yoon KS, Clark JM. A New Ivermectin Formulation Topically Kills Permethrin-Resistant Human Head Lice (Anoplura: Pediculidae). *J Med Entomol*. 2008 Jan 1;45(1):75–81.
100. Sanchezruiz WL, Nuzum DS, Kouzi SA. Oral ivermectin for the treatment of head lice infestation. *Am J Health-Syst Pharm AJHP Off J Am Soc Health-Syst Pharm*. 2018 Jul 1;75(13):937–43.
101. Amanzougaghene N, Fenollar F, Raoult D, Mediannikov O. Where Are We With Human Lice? A Review of the Current State of Knowledge. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:474.
102. Aditya S, Rattan A. Spinosad: An effective and safe pediculicide. *Indian Dermatol Online J*. 2012;3(3):213.
103. Strycharz JP, Berge NM, Alves A-M, Clark JM. Ivermectin acts as a posteclosion nymphicide by reducing blood feeding of human head lice (Anoplura: Pediculidae) that hatched from treated eggs. *J Med Entomol*. 2011 Nov;48(6):1174–82.
104. Amanzougaghene N, Fenollar F, Diatta G, Sokhna C, Raoult D, Mediannikov O. Mutations in GluCl associated with ivermectin Field-Resistant Head lice from Senegal. *Int J Antimicrob Agents*. 2018 Jul 25;
105. Amanzougaghene N, Fenollar F, Nappez C, Ben-Amara A, Decloquement P, Azza S, et al. Complexin in ivermectin resistance in body lice. *PLoS Genet*. 2018 Aug;14(8):e1007569.
106. Diatta G, Abat C, Sokhna C, Tissot-Dupont H, Rolain J-M, Raoult D. Head lice probably resistant to ivermectin recovered from two rural girls in Dielmo, a village in Sine-Saloum, Senegal. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Jun;47(6):501–2.
107. Lubega GW, Prichard RK. Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin: high-affinity binding and benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990 Jan 15;38(2):221–32.
108. Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J Mol Graph Model*. 2004 Dec;23(3):275–84.
109. Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol*. 1988 Nov;18(7):885–936.
110. Von Samson-Himmelstjerna G, Harder A, Sangster NC, Coles GC. Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle. *Parasitology*. 2005 Mar;130(3):343–7.
111. Kulke D, von Samson-Himmelstjerna G, Miltsch SM, Wolstenholme AJ, Jex AR, Gasser RB, et al. Characterization of the Ca²⁺-Gated and Voltage-Dependent K⁺-Channel Slo-1 of Nematodes and Its Interaction with Emodepside. Williams DL, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Dec 18;8(12):e3401.
112. Harrow ID, Gration KAF. Mode of action of the anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole on muscle cell membrane of the nematode *Ascaris suum*. *Pestic Sci*. 1985 Dec;16(6):662–72.

113. Courtot E, Charvet CL, Beech RN, Harmache A, Wolstenholme AJ, Holden-Dye L, et al. Functional Characterization of a Novel Class of Morantel-Sensitive Acetylcholine Receptors in Nematodes. Aroian RV, editor. *PLOS Pathog.* 2015 Dec 1;11(12):e1005267.
114. Choudhary S, Tipton JG, Abongwa M, Brewer MT, Chelladurai JJ, Musselman N, et al. Pharmacological characterization of a homomeric nicotinic acetylcholine receptor formed by *Ancylostoma caninum* ACR-16. *Invertebr Neurosci* IN. 2019 Sep 5;19(4):11.
115. Wolstenholme AJ. Glutamate-gated Chloride Channels. *J Biol Chem.* 2012 Nov 23;287(48):40232–8.
116. Fuse T, Kita T, Nakata Y, Ozoe F, Ozoe Y. Electrophysiological characterization of ivermectin triple actions on *Musca* chloride channels gated by l -glutamic acid and γ -aminobutyric acid. *Insect Biochem Mol Biol.* 2016 Oct;77:78–86.
117. Campbell WC. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 May;13(6):853–65.
118. Prichard R, Ménez C, Lespine A. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2012 Dec;2:134–53.
119. Prichard RK, Geary TG. Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2019;10:69–83.
120. Yates DM, Portillo V, Wolstenholme AJ. The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol.* 2003 Sep;33(11):1183–93.
121. Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Parese PS, Van der Ploeg LH, Schaeffer JM, et al. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1994 Oct 20;371(6499):707–11.
122. Wolstenholme AJ, Rogers AT. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology.* 2006 Mar 29;131(S1):S85.
123. Chen I-S, Kubo Y. Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. *J Physiol.* 2018 May 15;596(10):1833–45.
124. Lumaret J-P, Errouissi F, Floate K, Rombke J, Wardhaugh K. A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial and Aquatic Environments. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012 Apr 1;13(6):1004–60.
125. Verdú JR, Cortez V, Martínez-Pinna J, Ortiz AJ, Lumaret J-P, Lobo JM, et al. First assessment of the comparative toxicity of ivermectin and moxidectin in adult dung beetles: Sub-lethal symptoms and pre-lethal consequences. *Sci Rep [Internet].* 2018 Dec [cited 2018 Oct 5];8(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-33241-0>
126. Verdú JR, Lobo JM, Sánchez-Piñero F, Gallego B, Numa C, Lumaret J-P, et al. Ivermectin residues disrupt dung beetle diversity, soil properties and ecosystem functioning: An interdisciplinary field study. *Sci Total Environ.* 2018 Mar;618:219–28.
127. Beynon SA. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Vet Parasitol.* 2012 Sep;189(1):113–24.
128. Cooke AS, Morgan ER, Dungait JAJ. Modelling the impact of targeted anthelmintic treatment of cattle on dung fauna. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017 Oct;55:94–8.
129. Eichberg C, Wohde M, Müller K, Rausch A, Scherrmann C, Scheuren T, et al. The Anthelmintic Ingredient Moxidectin Negatively Affects Seed Germination of Three Temperate Grassland Species. Abhilash PC, editor. *PLOS ONE.* 2016 Nov 15;11(11):e0166366.
130. Serafini S, Soares JG, Perosa CF, Picoli F, Segat JC, Da Silva AS, et al. Eprinomectin antiparasitic affects survival, reproduction and behavior of *Folsomia candida* biomarker, and its toxicity depends on the type of soil. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019 Nov;72:103262.

131. Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage J-F, Drag M, Soll M, et al. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol*. 2003 Jan 24;460(2–3):85–91.
132. Craig TM, Hatfield TA, Pankavich JA, Wang GT. Efficacy of moxidectin against an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol*. 1992 Mar;41(3–4):329–33.
133. Wolstenholme AJ, Maclean MJ, Coates R, McCoy CJ, Reaves BJ. How do the macrocyclic lactones kill filarial nematode larvae? *Invert Neurosci* [Internet]. 2016 Sep [cited 2018 Sep 20];16(3). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10158-016-0190-7>
134. Cornejo I, Andrini O, Niemeyer MI, Marabolí V, González-Nilo FD, Teulon J, et al. Identification and Functional Expression of a Glutamate- and Avermectin-Gated Chloride Channel from *Caligus rogercresseyi*, a Southern Hemisphere Sea Louse Affecting Farmed Fish. Lynagh T, editor. *PLoS Pathog*. 2014 Sep 25;10(9):e1004402.
135. S Khalil M. Abamectin and Azadirachtin as Eco-friendly Promising Biorational Tools in Integrated Nematodes Management Programs. *J Plant Pathol Microbiol* [Internet]. 2013 [cited 2020 Sep 1];4(4). Available from: <https://www.omicsonline.org/abamectin-and-azadirachtin-as-eco-friendly-promising-biorational-tools-in-integrated-nematodes-management-programs-2157-7471.1000174.php?aid=14020>
136. Horsberg TE. Avermectin use in aquaculture. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012 May;13(6):1095–102.
137. Shoop WL, Egerton JR, Eary CH, Haines HW, Michael BF, Mrozik H, et al. Eprinomectin: a novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle. *Int J Parasitol*. 1996 Nov;26(11):1237–42.
138. Shoop WL, DeMontigny P, Fink DW, Williams JB, Egerton JR, Mrozik H, et al. Efficacy in sheep and pharmacokinetics in cattle that led to the selection of eprinomectin as a topical endectocide for cattle. *Int J Parasitol*. 1996 Nov;26(11):1227–35.
139. Banks BJ, Bishop BF, Evans NA, Gibson SP, Goudie AC, Gratton KA, et al. Avermectins and flea control: structure-activity relationships and the selection of selamectin for development as an endectocide for companion animals. *Bioorg Med Chem*. 2000 Aug;8(8):2017–25.
140. Lespine A, Martin S, Dupuy J, Roulet A, Pineau T, Orlowski S, et al. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: Structure–affinity relationship. *Eur J Pharm Sci*. 2007 Jan;30(1):84–94.
141. Yoon KS, Strycharz JP, Baek JH, Sun W, Kim JH, Kang JS, et al. Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance: Ivermectin over-transcribes genes in lice. *Insect Mol Biol*. 2011 Dec;20(6):687–99.
142. Kim JH, Gellatly KJ, Lueke B, Kohler M, Nauen R, Murenzi E, et al. Detoxification of ivermectin by ATP binding cassette transporter C4 and cytochrome P450 monooxygenase 6CJ1 in the human body louse, *Pediculus humanus humanus*: Detoxification of ivermectin by ABCC4 and CYP6CJ1. *Insect Mol Biol*. 2018 Feb;27(1):73–82.
143. Becker S, Webster A, Doyle RL, Martins JR, Reck J, Klafke GM. Resistance to deltamethrin, fipronil and ivermectin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus sensu stricto*, Latreille (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick-Borne Dis*. 2019;10(5):1046–50.
144. El-Ashram S, Aboelhadid SM, Kamel AA, Mahrous LN, Fahmy MM. First Report of Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* in Egypt Resistant to Ivermectin. *Insects*. 2019 Nov 15;10(11):404.
145. Le Gall VL, Klafke GM, Torres TT. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Sci Rep*. 2018 Aug 17;8(1):12401.
146. Doherty E, Burgess S, Mitchell S, Wall R. First evidence of resistance to macrocyclic lactones in *Psoroptes ovis* sheep scab mites in the UK. *Vet Rec*. 2018 Jan 27;182(4):106–106.
147. Bravo S, Sevatdal S, Horsberg TE. Sensitivity assessment of *Caligus rogercresseyi* to emamectin benzoate in Chile. *Aquaculture*. 2008 Sep;282(1–4):7–12.

148. Mermans C, Dermauw W, Geibel S, Van Leeuwen T. A G326E substitution in the glutamate-gated chloride channel 3 (GluCl3) of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* abolishes the agonistic activity of macrocyclic lactones: Abolition of agonistic activity of macrocyclic lactones. *Pest Manag Sci*. 2017 Dec;73(12):2413–8.
149. Wang X, Puinean AM, O'Reilly AO, Williamson MS, Smelt CLC, Millar NS, et al. Mutations on M3 helix of *Plutella xylostella* glutamate-gated chloride channel confer unequal resistance to abamectin by two different mechanisms. *Insect Biochem Mol Biol*. 2017 Jul;86:50–7.
150. Meng X, Yang X, Zhang N, Jiang H, Ge H, Chen M, et al. Knockdown of the GABA receptor RDL genes decreases abamectin susceptibility in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Pestic Biochem Physiol*. 2019 Jan;153:171–5.
151. Osei-Atweneboana MY, Awadzi K, Attah SK, Boakye DA, Gyapong JO, Prichard RK. Phenotypic evidence of emerging ivermectin resistance in *Onchocerca volvulus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Mar 29;5(3):e998.
152. Bourguinat C, Lee ACY, Lizundia R, Blagburn BL, Liotta JL, Kraus MS, et al. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Vet Parasitol*. 2015 Jun;210(3–4):167–78.
153. Wolstenholme AJ, Evans CC, Jimenez PD, Moorhead AR. The emergence of macrocyclic lactone resistance in the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*. 2015 Sep;142(10):1249–59.
154. Williamson SM, Storey B, Howell S, Harper KM, Kaplan RM, Wolstenholme AJ. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. 2011 Dec;180(2):99–105.
155. van Wyk JA, Malan FS, Randles JL. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Vet Parasitol*. 1997 Jun;70(1–3):111–22.
156. von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, Schürmann S, Rohn K, Schnieder T, et al. Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol*. 2007 Mar 15;144(1–2):74–80.
157. Stoneham S, Coles G. Ivermectin resistance in *Parascaris equorum*. *Vet Rec*. 2006 Apr 22;158(16):572.
158. Schougaard H, Nielsen MK. Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Vet Rec*. 2007 Mar 31;160(13):439–40.
159. Veronesi F, Fioretti DP, Genchi C. Are macrocyclic lactones useful drugs for the treatment of *Parascaris equorum* infections in foals? *Vet Parasitol*. 2010 Aug;172(1–2):164–7.
160. Boersema JH, Eysker M, Nas JWM. Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet Rec*. 2002 Mar 2;150(9):279–81.
161. Lindgren K, Ljungvall O, Nilsson O, Ljungström B-L, Lindahl C, Höglund J. *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Vet Parasitol*. 2008 Feb 14;151(2–4):337–43.
162. Beasley A, Coleman G, Kotze A. Suspected ivermectin resistance in a south-east Queensland *Parascaris equorum* population. *Aust Vet J*. 2015 Sep;93(9):305–7.
163. Molento MB, Antunes J, Bentes RN, Coles GC. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet Rec*. 2008 Mar 22;162(12):384–5.
164. Slocombe JOD, de Gannes RVG, Lake MC. Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Vet Parasitol*. 2007 Apr 30;145(3–4):371–6.
165. Craig TM, Diamond PL, Ferwerda NS, Thompson JA. Evidence of Ivermectin Resistance by *Parascaris equorum* on a Texas Horse Farm. *J Equine Vet Sci*. 2007 Feb;27(2):67–71.

166. Lyons ET, Tolliver SC, Ionita M, Collins SS. Evaluation of parasitocidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxi-bendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. *Parasitol Res.* 2008 Jul;103(2):287–91.
167. Martin F, Svansson V, Eydal M, Oddsdóttir C, Ernback M, Persson I, et al. First Report of Resistance to Ivermectin in *Parascaris univalens* in Iceland. *J Parasitol.* 2021 Jan 1;107(1):16–22.
168. Martin F, Höglund J, Bergström TF, Karlsson Lindsjö O, Tydén E. Resistance to pyrantel embonate and efficacy of fenbendazole in *Parascaris univalens* on Swedish stud farms. *Vet Parasitol.* 2018 Dec 15;264:69–73.
169. Paraud C, Marcotty T, Lespine A, Sutra JF, Pors I, Devos I. Cross-resistance to moxidectin and ivermectin on a meat sheep farm in France. *Vet Parasitol.* 2016 Aug;226:88–92.
170. Njue AI, Hayashi J, Kinne L, Feng X-P, Prichard RK. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *J Neurochem.* 2004 Jun;89(5):1137–47.
171. McCavera S, Rogers AT, Yates DM, Woods DJ, Wolstenholme AJ. An Ivermectin-Sensitive Glutamate-Gated Chloride Channel from the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Mol Pharmacol.* 2009 Jun 1;75(6):1347–55.
172. Ghosh R, Andersen EC, Shapiro JA, Gerke JP, Kruglyak L. Natural Variation in a Chloride Channel Subunit Confers Ivermectin Resistance in *C. elegans*. *Science.* 2012 Feb 3;335(6068):574–8.
173. Njue AI, Prichard RK. Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*. *Parasitology.* 2004 Dec;129(Pt 6):741–51.
174. Kotze AC, Hunt PW, Skuce P, von Samson-Himmelstjerna G, Martin RJ, Sager H, et al. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014 Dec;4(3):164–84.
175. Khan S, Nisar A, Yuan J, Luo X, Dou X, Liu F, et al. A Whole Genome Re-Sequencing Based GWA Analysis Reveals Candidate Genes Associated with Ivermectin Resistance in *Haemonchus contortus*. *Genes.* 2020 Mar 28;11(4).
176. Atif M, Estrada-Mondragon A, Nguyen B, Lynch JW, Keramidis A. Effects of glutamate and ivermectin on single glutamate-gated chloride channels of the parasitic nematode *H. contortus*. Wolstenholme AJ, editor. *PLOS Pathog.* 2017 Oct 2;13(10):e1006663.
177. Atif M, Smith JJ, Estrada-Mondragon A, Xiao X, Salim AA, Capon RJ, et al. GluClR-mediated inhibitory postsynaptic currents reveal targets for ivermectin and potential mechanisms of ivermectin resistance. *PLoS Pathog.* 2019 Jan 29;15(1):e1007570.
178. El-Abdellati A, De Graef J, Van Zeven A, Donnan A, Skuce P, Walsh T, et al. Altered *avr-14B* gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *Int J Parasitol.* 2011 Aug;41(9):951–7.
179. Degani-Katzav N, Klein M, Har-Even M, Gortler R, Tobi R, Paas Y. Trapping of ivermectin by a pentameric ligand-gated ion channel upon open-to-closed isomerization. *Sci Rep.* 2017 20;7:42481.
180. Bygarski EE, Prichard RK, Ardelli BF. Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014 Dec;4(3):143–51.
181. Demeler J, Krücken J, AlGusbi S, Ramünke S, De Graef J, Kerboeuf D, et al. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Mol Biochem Parasitol.* 2013 Mar;188(1):10–9.
182. Ménez C, Alberich M, Kansoh D, Blanchard A, Lespine A. Acquired Tolerance to Ivermectin and Moxidectin after Drug Selection Pressure in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Aug;60(8):4809–19.

183. Nielsen MK, Sauermann CW, Leathwick DM. The effect of climate, season, and treatment intensity on anthelmintic resistance in cyathostomins: A modelling exercise. *Vet Parasitol.* 2019 May;269:7–12.
184. Sauermann CW, Nielsen MK, Luo D, Leathwick DM. Modelling the development of anthelmintic resistance in cyathostomin parasites: The importance of genetic and fitness parameters. *Vet Parasitol.* 2019 May;269:28–33.
185. Weber T, Selzer PM. Isoxazoline: A Novel Chemotype Highly Effective on Ectoparasites. *ChemMedChem.* 2016 Feb;11(3):270–6.
186. Gonçalves IL, Machado das Neves G, Porto Kagami L, Eifler-Lima VL, Merlo AA. Discovery, development, chemical diversity and design of isoxazoline-based insecticides. *Bioorg Med Chem.* 2021 Jan 15;30:115934.
187. Rufener L, Danelli V, Bertrand D, Sager H. The novel isoxazoline ectoparasiticide lotilaner (Credelio™): a non-competitive antagonist specific to invertebrates γ -aminobutyric acid-gated chloride channels (GABACs). *Parasit Vectors* [Internet]. 2017 Dec [cited 2018 Jun 5];10(1). Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2470-4>
188. Machado MA, Campos DR, Lopes NL, Bastos IPB, Alves MSR, Correia TR, et al. Efficacy of afoxolaner in the flea control in experimentally infested cats. *Rev Bras Parasitol Vet Braz J Vet Parasitol Orgao Of Col Bras Parasitol Vet.* 2019 Dec;28(4):760–3.
189. Tinkruejeen G, Meesaimongkon P, Tangtrongsup S, Thitaram N, Srifawattana N, Beugnet F, et al. Comparative efficacy of afoxolaner and ivermectin in dogs naturally infested with *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*: A clinical field study conducted in Thailand. *Vet Parasitol Reg Stud Rep.* 2019;18:100340.
190. Packianathan R, Hodge A, Bruellke N, Jackson C, Maeder S. Efficacy of combination products containing sarolaner, moxidectin and pyrantel (Simparica Trio™) or afoxolaner and milbemycin (NexGard Spectra®) against induced infestations of *Ixodes holocyclus* in dogs. *Parasit Vectors.* 2020 Sep 5;13(1):448.
191. Petersen I, Chiummo R, Zschiesche E, Karas-Tecza J, Rapti D, Roepke R, et al. A European field assessment of the efficacy of fluralaner (Bravecto®) chewable and spot-on formulations for treatment of dogs with generalized demodicosis. *Parasit Vectors* [Internet]. 2020 Dec [cited 2021 Feb 15];13(1). Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04159-2>
192. Fisara P, Guerino F, Sun F. Investigation of the efficacy of fluralaner spot-on (Bravecto®) against infestations of *Ixodes holocyclus* on cats. *Parasit Vectors.* 2018 Jun 26;11(1):366.
193. Fisara P, Guerino F, Sun F. Efficacy of a spot-on combination of fluralaner plus moxidectin (Bravecto® Plus) in cats following repeated experimental challenge with a field isolate of *Ctenocephalides felis*. *Parasit Vectors.* 2019 May 23;12(1):259.
194. Hinkle NC, Jirjis F, Szewczyk E, Sun F, Flochlay-Sigognault A. Efficacy and safety assessment of a water-soluble formulation of fluralaner for treatment of natural *Ornithonyssus sylviarum* infestations in laying hens. *Parasit Vectors.* 2018 20;11(1):99.
195. Becskei C, Kryda K, Fias D, Follis SL, Wozniakiewicz M, Mahabir SP, et al. Field efficacy and safety of a novel oral chewable tablet containing sarolaner, moxidectin and pyrantel (Simparica Trio™) against naturally acquired gastrointestinal nematode infections in dogs presented as veterinary patients in Europe and the USA. *Parasit Vectors* [Internet]. 2020 Dec [cited 2021 Feb 15];13(1). Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-3947-0>
196. Becskei C, Fias D, Mahabir SP, Farkas R. Efficacy of a novel oral chewable tablet containing sarolaner, moxidectin and pyrantel (Simparica Trio™) against natural flea and tick infestations on dogs presented as veterinary patients in Europe. *Parasit Vectors* [Internet]. 2020 Dec [cited 2021 Feb 15];13(1). Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-3946-1>
197. Packianathan R, Pittorino M, Hodge A, Bruellke N, Graham K. Safety and efficacy of a new spot-on formulation of selamectin plus sarolaner in the treatment and control of naturally occurring flea infestations in cats presented as

veterinary patients in Australia. *Parasit Vectors* [Internet]. 2020 Dec [cited 2021 Feb 15];13(1). Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04099-x>

198. Ozoe Y, Asahi M, Ozoe F, Nakahira K, Mita T. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan;391(1):744–9.
199. Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J, O'Meara GF, Haythornthwaite A, Newman RJ, et al. Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003 Sep 17;23(24):8608–17.
200. Raymond V, Sattelle DB. Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Jun;1(6):427–36.
201. Crestani F, Keist R, Fritschy J-M, Benke D, Vogt K, Prut L, et al. Trace fear conditioning involves hippocampal $\alpha 5$ GABA(A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8980–5.
202. Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol*. 1993 Feb 20;229(4):1101–24.
203. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol*. 1999 May 14;288(4):765–86.
204. Hibbs RE, Gouaux E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*. 2011 Jun 2;474(7349):54–60.
205. Beech RN, Wolstenholme AJ, Neveu C, Dent JA. Nematode parasite genes: what's in a name? *Trends Parasitol*. 2010 Jul;26(7):334–40.
206. Cully DF, Paress PS, Liu KK, Schaeffer JM, Arena JP. Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent ivermectin. *J Biol Chem*. 1996 Aug 16;271(33):20187–91.
207. Dent JA, Davis MW, Avery L. *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*. 1997 Oct 1;16(19):5867–79.
208. Cook A, Aptel N, Portillo V, Siney E, Sihota R, Holden-Dye L, et al. *Caenorhabditis elegans* ivermectin receptors regulate locomotor behaviour and are functional orthologues of *Haemonchus contortus* receptors. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 May;147(1):118–25.
209. Holden-Dye L, Walker RJ. Actions of glutamate and ivermectin on the pharyngeal muscle of *Ascaridia galli*: A comparative study with *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol*. 2006 Apr;36(4):395–402.
210. Boulin T, Gielen M, Richmond JE, Williams DC, Paoletti P, Bessereau J-L. Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Nov 25;105(47):18590–5.
211. Démares F, Drouard F, Massou I, Crattelet C, Lœuillet A, Bettiol C, et al. Differential involvement of glutamate-gated chloride channel splice variants in the olfactory memory processes of the honeybee *Apis mellifera*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014 Sep;124:137–44.
212. Blanchard A, Guégnard F, Charvet CL, Crisford A, Courtot E, Sauvé C, et al. Deciphering the molecular determinants of cholinergic anthelmintic sensitivity in nematodes: When novel functional validation approaches highlight major differences between the model *Caenorhabditis elegans* and parasitic species. *PLoS Pathog*. 2018;14(5):e1006996.
213. Brown DDR, Siddiqui SZ, Kaji MD, Forrester SG. Pharmacological characterization of the *Haemonchus contortus* GABA-gated chloride channel, Hco-UNC-49: modulation by macrocyclic lactone anthelmintics and a receptor for piperazine. *Vet Parasitol*. 2012 Apr 30;185(2–4):201–9.
214. Hartiadi LY, Ahring PK, Chebib M, Absalom NL. High and low GABA sensitivity $\alpha 4\beta 2\delta$ GABAA receptors are expressed in *Xenopus laevis* oocytes with divergent stoichiometries. *Biochem Pharmacol*. 2016 Mar 1;103:98–108.

215. Démares F, Raymond V, Armengaud C. Expression and localization of glutamate-gated chloride channel variants in honeybee brain (*Apis mellifera*). *Insect Biochem Mol Biol*. 2013 Jan;43(1):115–24.
216. Jones AK, Bera AN, Lees K, Sattelle DB. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Heredity*. 2010 Mar;104(3):247–59.
217. Jones AK, Sattelle DB. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*. 2007;8(1):327.
218. Jones AK, Sattelle DB. The cys-loop ligand-gated ion channel superfamily of the honeybee, *Apis mellifera*. *Invert Neurosci*. 2006 Sep;6(3):123–32.
219. Buckingham SD. Insect GABA Receptors: Splicing, Editing, and Targeting by Antiparasitics and Insecticides. *Mol Pharmacol*. 2005 Jul 18;68(4):942–51.
220. Jones AK, Buckingham SD, Papadaki M, Yokota M, Sattelle BM, Matsuda K, et al. Splice-Variant- and Stage-Specific RNA Editing of the *Drosophila* GABA Receptor Modulates Agonist Potency. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4287–92.
221. Taylor-Wells J, Senan A, Bermudez I, Jones AK. Species specific RNA A-to-I editing of mosquito RDL modulates GABA potency and influences agonistic, potentiating and antagonistic actions of ivermectin. *Insect Biochem Mol Biol*. 2018 Feb;93:1–11.
222. Bianchi L. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. WormBook [Internet]. 2006 [cited 2018 Jul 20]; Available from: http://www.wormbook.org/chapters/www_channelexpress/channelexpress.html
223. Williamson SM, Walsh TK, Wolstenholme AJ. The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Brugia malayi* and *Trichinella spiralis*: a comparison with *Caenorhabditis elegans*. *Invert Neurosci*. 2007 Nov 23;7(4):219–26.
224. Jagannathan S, Laughton DL, Critten CL, Skinner TM, Horoszok L, Wolstenholme AJ. Ligand-gated chloride channel subunits encoded by the *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum* orthologues of the *Caenorhabditis elegans* gbr-2 (avr-14) gene. *Mol Biochem Parasitol*. 1999 Oct 15;103(2):129–40.
225. Yates DM, Wolstenholme AJ. An ivermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel subunit from *Dirofilaria immitis*. *Int J Parasitol*. 2004 Aug;34(9):1075–81.
226. Cheeseman CL, Delany NS, Woods DJ, Wolstenholme AJ. High-affinity ivermectin binding to recombinant subunits of the *Haemonchus contortus* glutamate-gated chloride channel. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 May;114(2):161–8.
227. Horoszok L, Raymond V, Sattelle DB, Wolstenholme AJ. GLC-3: a novel fipronil and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *Br J Pharmacol*. 2001 Mar;132(6):1247–54.
228. Tandon R, LePage KT, Kaplan RM. Cloning and characterization of genes encoding α and β subunits of glutamate-gated chloride channel protein in *Cylicocyclus nassatus*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Nov;150(1):46–55.
229. Forrester SG, Hamdan FF, Prichard RK, Beech RN. Cloning, sequencing, and developmental expression levels of a novel glutamate-gated chloride channel homologue in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jan 27;254(3):529–34.
230. Forrester SG, Prichard RK, Beech RN. A glutamate-gated chloride channel subunit from *Haemonchus contortus*: *Biochem Pharmacol*. 2002 Mar;63(6):1061–8.
231. Forrester SG, Prichard RK, Dent JA, Beech RN. *Haemonchus contortus*: HcGluCl α expressed in *Xenopus* oocytes forms a glutamate-gated ion channel that is activated by ibotenate and the antiparasitic drug ivermectin. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Jun;129(1):115–21.
232. Forrester SG, Beech RN, Prichard RK. Agonist enhancement of macrocyclic lactone activity at a glutamate-gated chloride channel subunit from *Haemonchus contortus*. *Biochem Pharmacol*. 2004 Mar 15;67(6):1019–24.

233. Vassilatis DK, Arena JP, Plasterk RH, Wilkinson HA, Schaeffer JM, Cully DF, et al. Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):33167–74.
234. Moreno Y, Nabhan JF, Solomon J, Mackenzie CD, Geary TG. Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia malayi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 16;107(46):20120–5.
235. Li BW, Rush AC, Weil GJ. High level expression of a glutamate-gated chloride channel gene in reproductive tissues of *Brugia malayi* may explain the sterilizing effect of ivermectin on filarial worms. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014 Aug;4(2):71–6.
236. Laughton DL, Lunt GG, Wolstenholme AJ. Reporter gene constructs suggest that the *Caenorhabditis elegans* avermectin receptor beta-subunit is expressed solely in the pharynx. *J Exp Biol*. 1997 May;200(Pt 10):1509–14.
237. Portillo V, Jagannathan S, Wolstenholme AJ. Distribution of glutamate-gated chloride channel subunits in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *J Comp Neurol*. 2003 Jul 21;462(2):213–22.
238. Delany NS, Laughton DL, Wolstenholme AJ. Cloning and localisation of an avermectin receptor-related subunit from *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Nov 30;97(1–2):177–87.
239. Wenick AS, Hobert O. Genomic cis-regulatory architecture and trans-acting regulators of a single interneuron-specific gene battery in *C. elegans*. *Dev Cell*. 2004 Jun;6(6):757–70.
240. Chalasani SH, Chronis N, Tsunozaki M, Gray JM, Ramot D, Goodman MB, et al. Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2007 Nov;450(7166):63–70.
241. Pemberton DJ, Franks CJ, Walker RJ, Holden-Dye L. Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl- α 2 in the function of the native receptor. *Mol Pharmacol*. 2001 May;59(5):1037–43.
242. Atif M, Lynch JW, Keramidias A. The effects of insecticides on two splice variants of the glutamate-gated chloride channel receptor of the major malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Br J Pharmacol*. 2019 Sep 3;
243. Furutani S, Okuhara D, Hashimoto A, Ihara M, Kai K, Hayashi H, et al. An L319F mutation in transmembrane region 3 (TM3) selectively reduces sensitivity to okaramine B of the *Bombyx mori* L-glutamate-gated chloride channel. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2017 Oct 3;81(10):1861–7.
244. Furutani S, Ihara M, Lees K, Buckingham SD, Partridge FA, David JA, et al. The fungal alkaloid Okaramine-B activates an L-glutamate-gated chloride channel from *Ixodes scapularis*, a tick vector of Lyme disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018 Aug;8(2):350–60.
245. Wu S-F, Mu X-C, Dong Y-X, Wang L-X, Wei Q, Gao C-F. Expression pattern and pharmacological characterisation of two novel alternative splice variants of the glutamate-gated chloride channel in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus*: Glutamate-gated chloride channels in the small brown planthopper. *Pest Manag Sci*. 2017 Mar;73(3):590–7.
246. Nakata Y, Fuse T, Yamato K, Asahi M, Nakahira K, Ozoe F, et al. A Single Amino Acid Substitution in the Third Transmembrane Region Has Opposite Impacts on the Selectivity of the Parasitocides Fluralaner and Ivermectin for Ligand-Gated Chloride Channels. *Mol Pharmacol*. 2017 Nov;92(5):546–55.
247. Eguchi Y, Ihara M, Ochi E, Shibata Y, Matsuda K, Fushiki S, et al. Functional characterization of *Musca* glutamate- and GABA-gated chloride channels expressed independently and coexpressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Mol Biol*. 2006 Dec;15(6):773–83.
248. Liu F, Shi X, Liang Y, Wu Q, Xu B, Xie W, et al. A 36-bp deletion in the alpha subunit of glutamate-gated chloride channel contributes to abamectin resistance in *Plutella xylostella*. *Entomol Exp Appl*. 2014 Nov;153(2):85–92.

249. Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and l-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Mol Biol*. 2014 Feb;45:111–24.
250. Xu Z, Wu Q, Xu Q, He L. From the Cover: Functional Analysis Reveals Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid-Gated Chloride Channels as Targets of Avermectins in the Carmine Spider Mite. *Toxicol Sci*. 2017 Jan;155(1):258–69.
251. Yang Y, Lv J, Gui B, Yin H, Wu X, Zhang Y, et al. A-to-I RNA editing alters less-conserved residues of highly conserved coding regions: implications for dual functions in evolution. *RNA N Y N*. 2008 Aug;14(8):1516–25.
252. Wang J, Chen L-F, Lin D-J, Zhang J-S, Zhao J-H, Xiao D, et al. Molecular cloning, characterization and functional analysis of GluCl from the oriental armyworm, *Mythimna separata* Walker. *Pestic Biochem Physiol*. 2019 May;156:56–62.
253. Meng X, Miao L, Ge H, Yang X, Dong F, Xu X, et al. Molecular characterization of glutamate-gated chloride channel and its possible roles in development and abamectin susceptibility in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Pestic Biochem Physiol*. 2019 Mar;155:72–80.
254. Meyers JJ, Gray M, Kuklinski W, Johnson LB, Snow CD, Black WC, et al. Characterization of the target of ivermectin, the glutamate-gated chloride channel, from *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol*. 2015 May 15;218(10):1478–86.
255. Liu H-P, Lin S-C, Lin C-Y, Yeh S-R, Chiang A-S. Glutamate-gated chloride channels inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cockroach, *Diploptera punctata*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005 Nov;35(11):1260–8.
256. Maleszka R, Helliwell P. Effect of Juvenile Hormone on Short-Term Olfactory Memory in Young Honeybees (*Apis mellifera*). *Horm Behav*. 2001 Nov;40(3):403–8.
257. French-Constant RH. Cloning of a putative GABAA receptor from cyclodiene-resistant *Drosophila*: a case study in the use of insecticide-resistant mutants to isolate neuroreceptors. *EXS*. 1993;63:210–23.
258. Menard C, Horvitz HR, Cannon S. Chimeric Mutations in the M2 Segment of the 5-Hydroxytryptamine-gated Chloride Channel MOD-1 Define a Minimal Determinant of Anion/Cation Permeability. *J Biol Chem*. 2005 Jul;280(30):27502–7.
259. Henry C, Cens T, Charnet P, Cohen-Solal C, Collet C, van-Dijk J, et al. Heterogeneous expression of GABA receptor-like subunits LCCH3 and GRD reveals functional diversity of *Apis mellifera* GABA receptors. *Br J Pharmacol*. 2020 May 20;bph.15135.
260. Del Villar SG, Jones AK. Cloning and Functional Characterisation of the Duplicated RDL Subunits from the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 31;19(8).
261. Yuan G, Gao W, Yang Y, Wu Y. Molecular cloning, genomic structure, and genetic mapping of two Rdl-orthologous genes of GABA receptors in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2010 Jun;74(2):81–90.
262. French-Constant RH, Rocheleau TA. *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *J Neurochem*. 1993 Jun;60(6):2323–6.
263. Taylor-Wells J, Brooke BD, Bermudez I, Jones AK. The neonicotinoid imidacloprid, and the pyrethroid deltamethrin, are antagonists of the insect Rdl GABA receptor. *J Neurochem*. 2015 Nov;135(4):705–13.
264. Jiang F, Zhang Y, Sun H, Meng X, Bao H, Fang J, et al. Identification of polymorphisms in *Cyrtorhinus lividipennis* RDL subunit contributing to fipronil sensitivity. *Pestic Biochem Physiol*. 2015 Jan;117:62–7.
265. Zheng Y, Priest B, Cully DF, Ludmerer SW. RdlDv, a novel GABA-gated chloride channel gene from the American dog tick *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003 Jun;33(6):595–9.
266. Chen R, Belelli D, Lambert JJ, Peters JA, Reyes A, Lan NC. Cloning and functional expression of a *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21;91(13):6069–73.
267. Le Goff G, Hamon A, Bergé J-B, Amichot M. Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *J Neurochem*. 2005 Mar;92(6):1295–305.

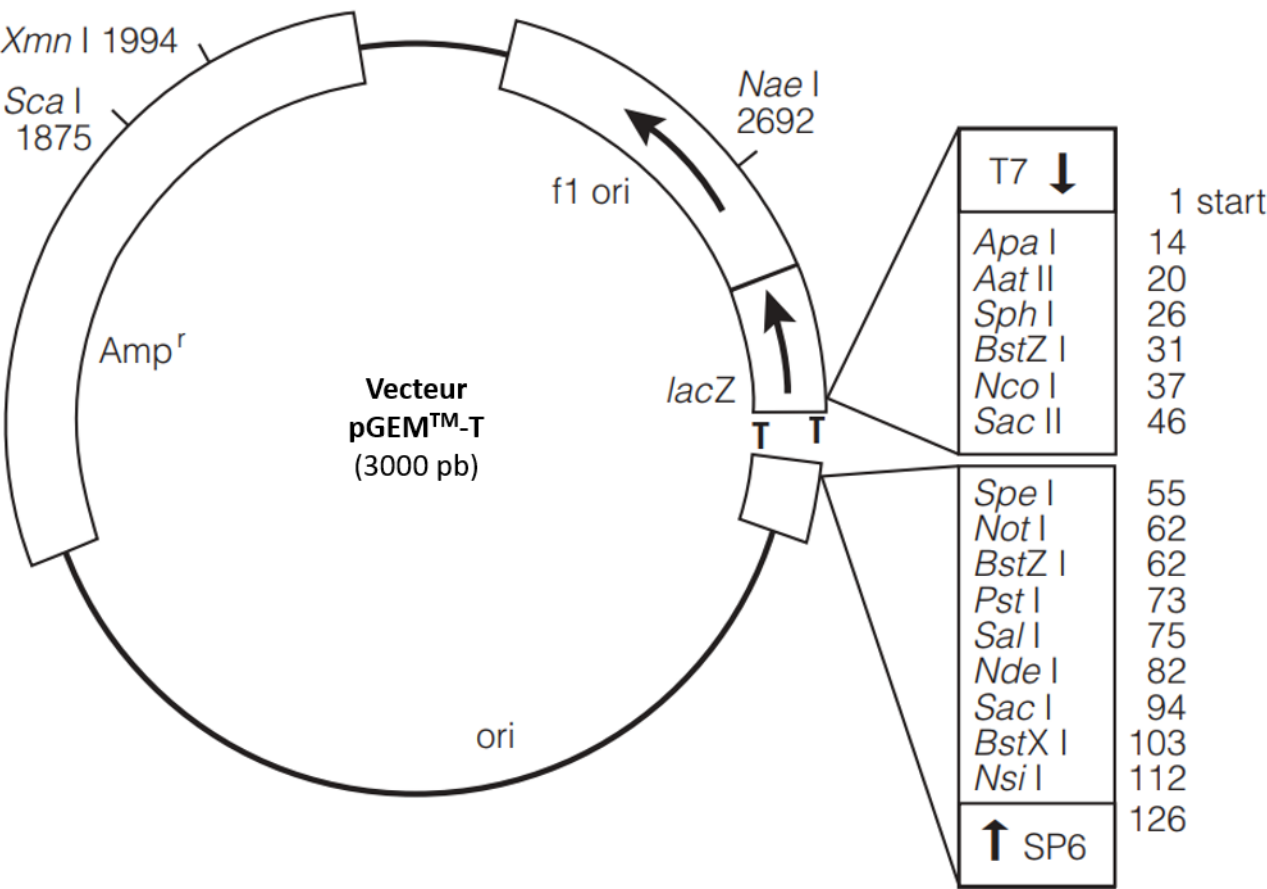
268. Jiang J, Huang L-X, Chen F, Sheng C-W, Huang Q-T, Han Z-J, et al. Novel alternative splicing of GABA receptor RDL exon 9 from *Laodelphax striatellus* modulates agonist potency. *Insect Sci.* 2020 Apr 15;
269. Garrood WT, Zimmer CT, Gutbrod O, Lüke B, Williamson MS, Bass C, et al. Influence of the RDL A301S mutation in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* on the activity of phenylpyrazole insecticides. *Pestic Biochem Physiol.* 2017 Oct;142:1–8.
270. Xu Z, Wu Q, Xu Q, He L. From the Cover: Functional Analysis Reveals Glutamate and Gamma-Aminobutyric Acid-Gated Chloride Channels as Targets of Avermectins in the Carmine Spider Mite. *Toxicol Sci.* 2017 Jan;155(1):258–69.
271. Ménard C, Folacci M, Brunello L, Charreton M, Collet C, Mary R, et al. Multiple combinations of RDL subunits diversify the repertoire of GABA receptors in the honeybee parasite *Varroa destructor*. *J Biol Chem.* 2018 Oct 17;
272. ffrench-Constant RH, Williamson MS, Davies TGE, Bass C. Ion channels as insecticide targets. *J Neurogenet.* 2016 Oct;30(3–4):163–77.
273. ffrench-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC, Chalmers AE. A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature.* 1993 Jun;363(6428):449–51.
274. Shotkoski F, Lee HJ, Zhang HG, Jackson MB, ffrench-Constant RH. Functional expression of insecticide-resistant GABA receptors from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 1994 Nov;3(4):283–7.
275. Guest M, Goodchild JA, Bristow JA, Flemming AJ. RDL A301S alone does not confer high levels of resistance to cyclodiene organochlorine or phenyl pyrazole insecticides in *Plutella xylostella*. *Pestic Biochem Physiol.* 2019 Jul;158:32–9.
276. Nakao T, Naoi A, Kawahara N, Hirase K. Mutation of the GABA receptor associated with fipronil resistance in the whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera*. *Pestic Biochem Physiol.* 2010 Jul;97(3):262–6.
277. Nakao T, Kawase A, Kinoshita A, Abe R, Hama M, Kawahara N, et al. The A2'N mutation of the RDL gamma-aminobutyric acid receptor conferring fipronil resistance in *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *J Econ Entomol.* 2011 Apr;104(2):646–52.
278. Bourdet I. La Drosophile comme modèle pour l'étude de la maladie d'Alzheimer : rôle de la protéine précurseur Amyloïde dans la mémoire olfactive. *Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI*; 2014.
279. Harrison JB, Chen HH, Sattelle E, Barker PJ, Huskisson NS, Rauh JJ, et al. Immunocytochemical mapping of a C-terminus anti-peptide antibody to the GABA receptor subunit, RDL in the nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 1996 May;284(2):269–78.
280. Wei Q, Wu S-F, Gao C-F. Molecular characterization and expression pattern of three GABA receptor-like subunits in the small brown planthopper *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Pestic Biochem Physiol.* 2017 Mar;136:34–40.
281. Cheung SK, Scott K. GABAA receptor-expressing neurons promote consumption in *Drosophila melanogaster*. Marion-Poll F, editor. *PLOS ONE.* 2017 Mar 31;12(3):e0175177.
282. Liu S, Lamaze A, Liu Q, Tabuchi M, Yang Y, Fowler M, et al. WIDE AWAKE Mediates the Circadian Timing of Sleep Onset. *Neuron.* 2014 Apr;82(1):151–66.
283. Yuan Q, Song Y, Yang C-H, Jan LY, Jan YN. Female contact modulates male aggression via a sexually dimorphic GABAergic circuit in *Drosophila*. *Nat Neurosci.* 2014 Jan;17(1):81–8.
284. Gisselmann G, Plonka J, Pusch H, Hatt H. *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *Br J Pharmacol.* 2004 Jun;142(3):409–13.
285. Dupuis JP, Bazetot M, Barbara GS, Pauthe S, Gauthier M, Raymond-Delpech V. Homomeric RDL and heteromeric RDL/LCCH3 GABA receptors in the honeybee antennal lobes: two candidates for inhibitory transmission in olfactory processing. *J Neurophysiol.* 2010 Jan;103(1):458–68.

286. Jia Z-Q, Sheng C-W, Tang T, Liu D, Leviticus K, Zhao C-Q, et al. Identification of the ionotropic GABA receptor-like subunits from the striped stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Pestic Biochem Physiol.* 2019 Mar;155:36–44.
287. Knipple DC, Soderlund DM. The ligand-gated chloride channel gene family of *Drosophila melanogaster*. *Pestic Biochem Physiol.* 2010 Jun;97(2):140–8.
288. Jones AK, Goven D, Froger J, Bantz A, Raymond V. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamilies of the cockroaches *BLATTELLA GERMANICA* and *PERIPLANETA AMERICANA*. *Pest Manag Sci* [Internet]. 2021 Jan 19 [cited 2021 Feb 9]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.6245>
289. Yamato K, Nakata Y, Takashima M, Ozoe F, Asahi M, Kobayashi M, et al. Effects of intersubunit amino acid substitutions on GABA receptor sensitivity to the ectoparasiticide fluralaner. *Pestic Biochem Physiol.* 2020 Feb;163:123–9.
290. Mumcuoglu KY, Danilevich M, Zelig O, Grinbaum H, Friger M, Meinking TL. Effects of blood type and blood handling on feeding success, longevity and egg production in the body louse, *Pediculus humanus humanus*. *Med Vet Entomol.* 2011 Mar;25(1):12–6.
291. Madeira F, Park Y mi, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 2;47(W1):W636–41.
292. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 2010 Feb;27(2):221–4.
293. Pettitt J, Harrison N, Stansfield I, Connolly B, Müller B. The evolution of spliced leader *trans* -splicing in nematodes. *Biochem Soc Trans.* 2010 Aug 1;38(4):1125–30.
294. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1974 May;77(1):71–94.
295. Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* 1991 Dec;10(12):3959–70.
296. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors.* 2014;7(1):37.
297. Furtado LFV, Medeiros C da S, Zuccherato LW, Alves WP, de Oliveira VNGM, da Silva VJ, et al. First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. *PloS One.* 2019;14(10):e0224108.
298. Hautala K, Näreaho A, Kauppinen O, Nielsen MK, Sukura A, Rajala-Schultz PJ. Risk factors for equine intestinal parasite infections and reduced efficacy of pyrantel embonate against *Parascaris* sp. *Vet Parasitol.* 2019 Sep;273:52–9.
299. Lassen B, Peltola S-M. Anthelmintic resistance of intestinal nematodes to ivermectin and pyrantel in Estonian horses. *J Helminthol.* 2015 Nov;89(6):760–3.
300. Wever CM, Farrington D, Dent JA. The Validation of Nematode-Specific Acetylcholine-Gated Chloride Channels as Potential Anthelmintic Drug Targets. Carlow CKS, editor. *PLOS ONE.* 2015 Sep 22;10(9):e0138804.
301. Raizen D. Methods for measuring pharyngeal behaviors. *WormBook.* 2012 Dec 18;1–13.
302. Cook A. Electrophysiological recordings from the pharynx. *WormBook* [Internet]. 2006 [cited 2020 Oct 22]; Available from: http://www.wormbook.org/chapters/www_pharyngealrecording/pharyngealrecording.html
303. Raza A, Qamar AG, Hayat K, Ashraf S, Williams AR. Anthelmintic resistance and novel control options in equine gastrointestinal nematodes. *Parasitology.* 2019;146(4):425–37.
304. Islam R, Lynch JW. Mechanism of action of the insecticides, lindane and fipronil, on glycine receptor chloride channels: Inhibition of glycine receptors by insecticides. *Br J Pharmacol.* 2012 Apr;165(8):2707–20.

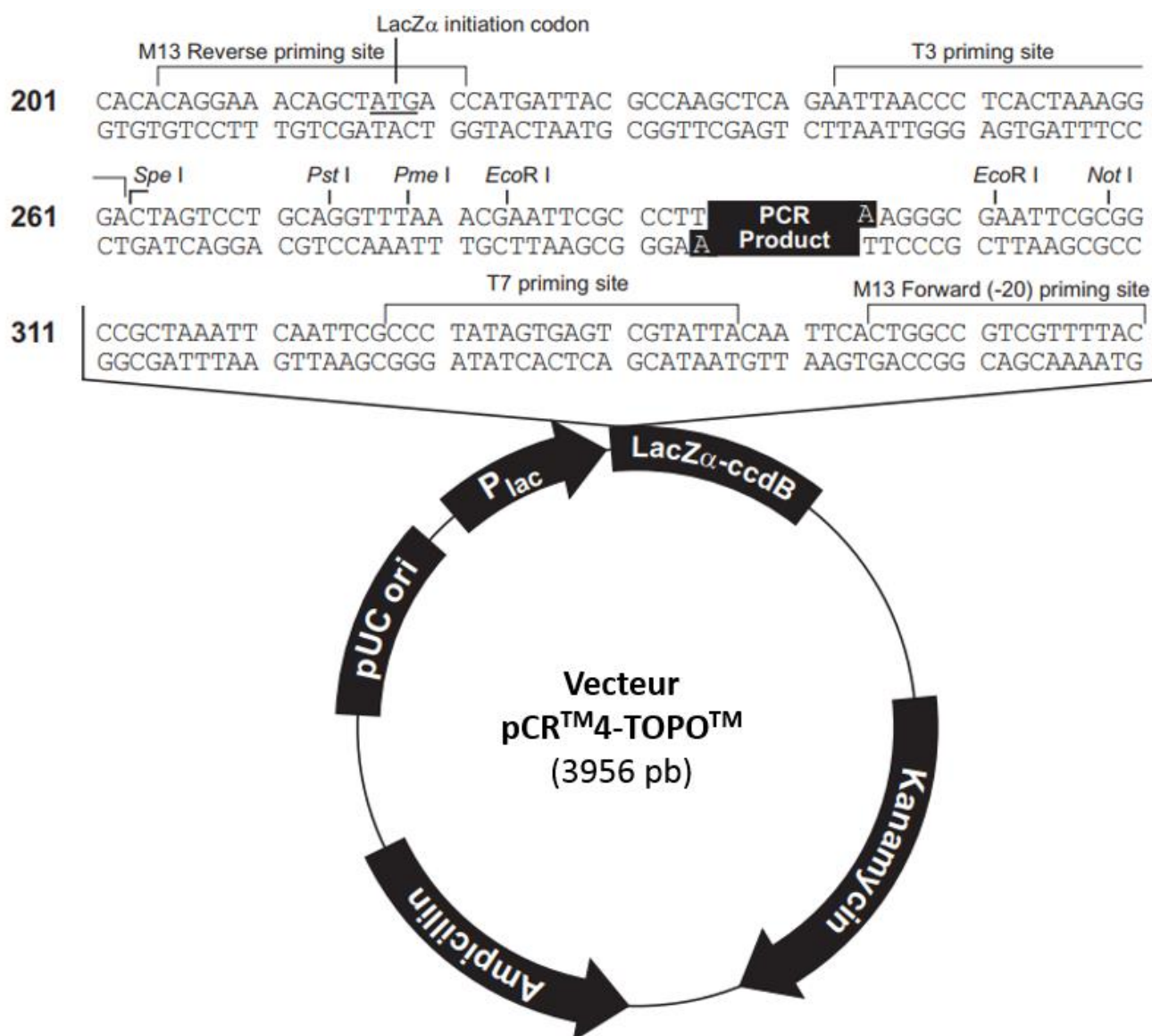
305. French-Constant RH, Steichen JC, Rocheleau TA, Aronstein K, Roush RT. A single-amino acid substitution in a gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proc Natl Acad Sci*. 1993 Mar 1;90(5):1957–61.
306. Casida JE, Durkin KA. Novel GABA receptor pesticide targets. *Pestic Biochem Physiol*. 2015 Jun;121:22–30.
307. Little SE. Lotilaner - a novel systemic tick and flea control product for dogs. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017 Dec [cited 2018 Jun 5];10(1). Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2471-3>
308. Cavalleri D, Murphy M, Gorbea RL, Seewald W, Drake J, Nanchen S. Laboratory evaluations of the immediate and sustained effectiveness of lotilaner (Credelio™) against three common species of ticks affecting dogs in Europe. *Parasit Vectors* [Internet]. 2017 Dec [cited 2019 Jan 18];10(1). Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2477-x>
309. Karadzovska D, Chappell K, Coble S, Murphy M, Cavalleri D, Wiseman S, et al. A randomized, controlled field study to assess the efficacy and safety of lotilaner flavored chewable tablets (Credelio™) in eliminating fleas in client-owned dogs in the USA. *Parasit Vectors*. 2017 Nov 1;10(1):528.
310. Kuntz EA, Kammanadiminti S. Safety evaluation of lotilaner in dogs after oral administration as flavoured chewable tablets (Credelio™). *Parasit Vectors*. 2017 Dec;10(1):538.
311. Kaplan RM, Vidyashankar AN. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet Parasitol*. 2012 May 4;186(1–2):70–8.
312. Heusser SA, Yoluk Ö, Klement G, Riederer EA, Lindahl E, Howard RJ. Functional characterization of neurotransmitter activation and modulation in a nematode model ligand-gated ion channel. *J Neurochem*. 2016 Jul;138(2):243–53.
313. Forrester SG, Prichard RK, Beech RN. A glutamate-gated chloride channel subunit from *Haemonchus contortus*: expression in a mammalian cell line, ligand binding, and modulation of anthelmintic binding by glutamate. *Biochem Pharmacol*. 2002 Mar 15;63(6):1061–8.
314. Lees F, Baillie M, Gettinby G, Revie CW. The Efficacy of Emamectin Benzoate against Infestations of *Lepeophtheirus salmonis* on Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar* L) in Scotland, 2002–2006. Thompson R, editor. *PLoS ONE*. 2008 Feb 6;3(2):e1549.
315. Lindley D. Merck's new drug free to WHO for river blindness programme. *Nature*. 1987 Oct;329(6142):752–752.
316. Chosidow O, Giraudeau B, Cottrell J, Izri A, Hofmann R, Mann SG, et al. Oral Ivermectin versus Malathion Lotion for Difficult-to-Treat Head Lice. *N Engl J Med*. 2010 Mar 11;362(10):896–905.
317. Ahmad HM, Abdel-Azim ES, Abdel-Aziz RT. Assessment of topical versus oral ivermectin as a treatment for head lice. *Dermatol Ther*. 2014 Oct;27(5):307–10.
318. Wei P, Che W, Wang J, Xiao D, Wang R, Luo C. RNA interference of glutamate-gated chloride channel decreases abamectin susceptibility in *Bemisia tabaci*. *Pestic Biochem Physiol*. 2018 Feb;145:1–7.
319. Shoop WL, Hartline EJ, Gould BR, Waddell ME, McDowell RG, Kinney JB, et al. Discovery and mode of action of afoxolaner, a new isoxazoline parasiticide for dogs. *Vet Parasitol*. 2014 Apr;201(3–4):179–89.
320. McTier TL, Chubb N, Curtis MP, Hedges L, Inskeep GA, Knauer CS, et al. Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. *Vet Parasitol*. 2016 May;222:3–11.
321. Cavalleri D, Murphy M, Seewald W, Drake J, Nanchen S. A randomised, blinded, controlled field study to assess the efficacy and safety of lotilaner tablets (Credelio™) in controlling fleas in client-owned dogs in European countries. *Parasit Vectors*. 2017 Nov 1;10(1):526.

322. Murphy M, Garcia R, Karadzovska D, Cavalleri D, Snyder D, Seewald W, et al. Laboratory evaluations of the immediate and sustained efficacy of lotilaner (Credelio™) against four common species of ticks affecting dogs in North America. *Parasit Vectors*. 2017 Nov 1;10(1):523.
323. Kane NS, Hirschberg B, Qian S, Hunt D, Thomas B, Brochu R, et al. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13949–54.
324. Boyle JP, Yoshino TP. Gene manipulation in parasitic helminths. *Int J Parasitol*. 2003 Sep;33(11):1259–68.
325. Selkirk ME, Huang SC, Knox DP, Britton C. The development of RNA interference (RNAi) in gastrointestinal nematodes. *Parasitology*. 2012 Apr;139(5):605–12.
326. Verma S, Kashyap SS, Robertson AP, Martin RJ. Functional genomics in *Brugia malayi* reveal diverse muscle nAChRs and differences between cholinergic anthelmintics. *Proc Natl Acad Sci*. 2017 May 23;114(21):5539–44.
327. Kashyap SS, Verma S, Voronin D, Lustigman S, Kulke D, Robertson AP, et al. Emodepside has sex-dependent immobilizing effects on adult *Brugia malayi* due to a differentially spliced binding pocket in the RCK1 region of the SLO-1 K channel. Geary TG, editor. *PLOS Pathog*. 2019 Sep 25;15(9):e1008041.
328. Storey B, Marcellino C, Miller M, Maclean M, Mostafa E, Howell S, et al. Utilization of computer processed high definition video imaging for measuring motility of microscopic nematode stages on a quantitative scale: “The Worminator.” *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014 Dec;4(3):233–43.

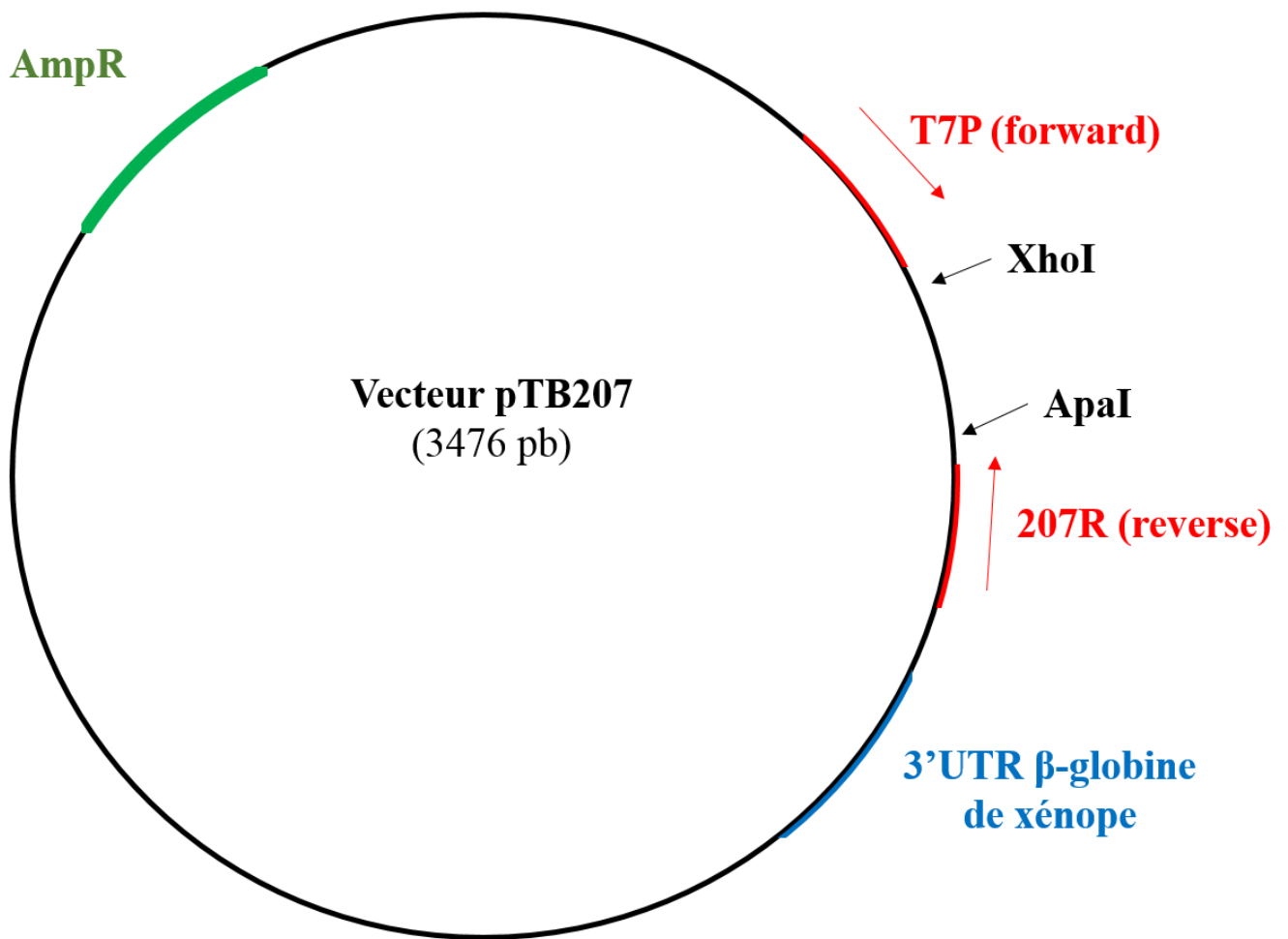
ANNEXES



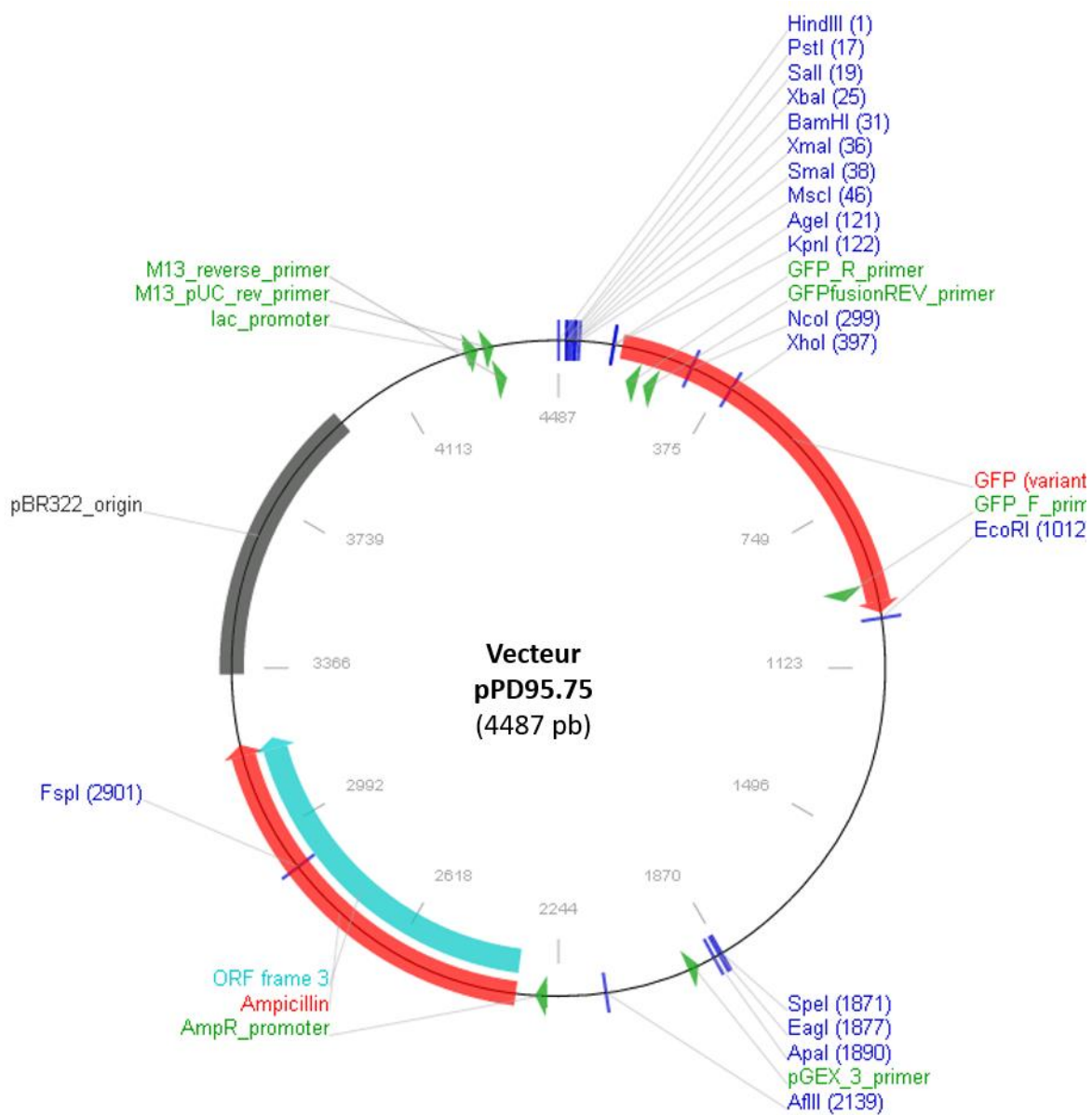
Annexe 1 : Carte du vecteur circulaire pGEM-T avec les sites de restrictions entourant la zone d'insertion (adaptée du manuel technique pGEM™-T and pGEM™-T Easy Vector Systems, Promega).



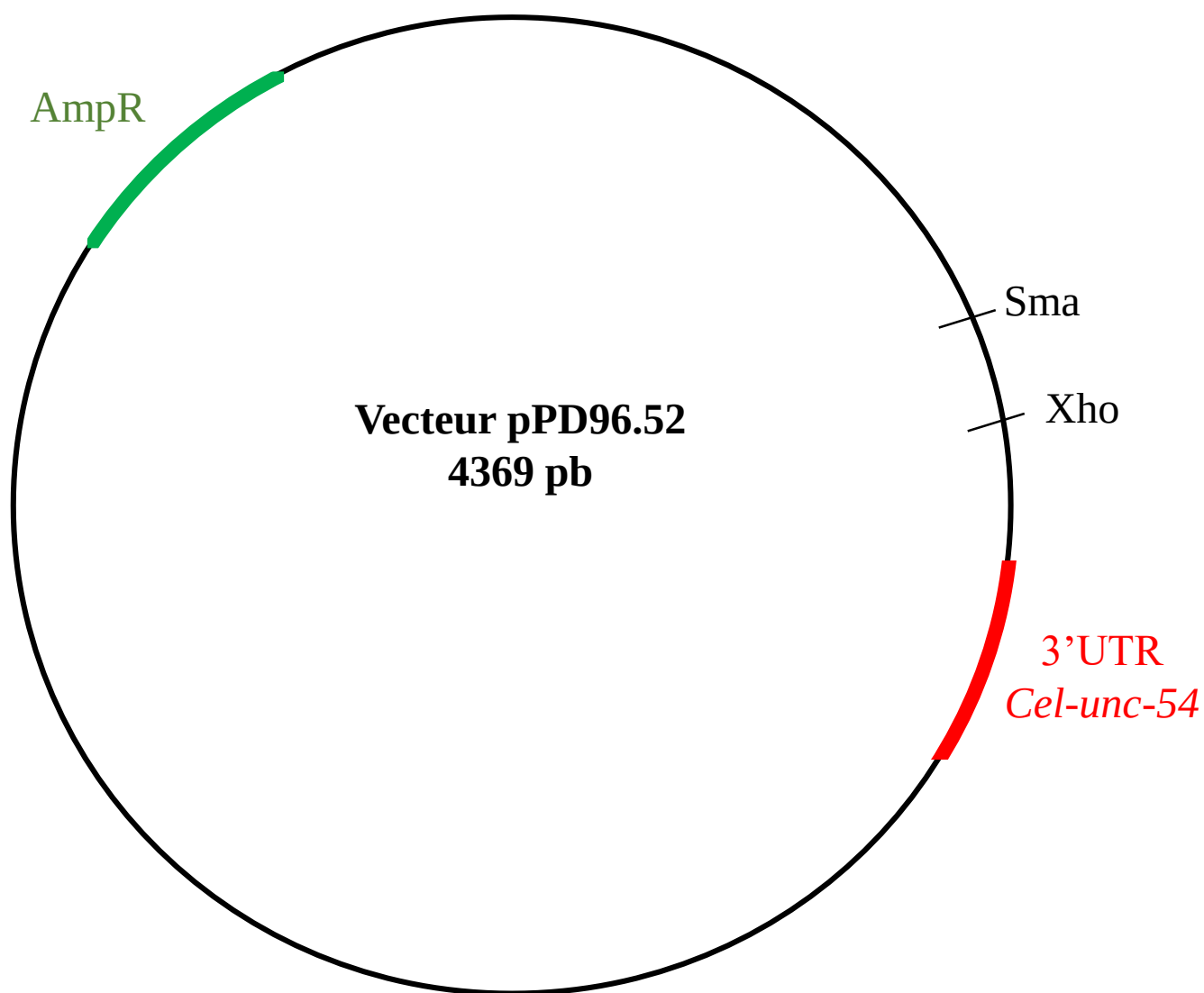
Annexe 2 : Carte schématique du vecteur circulaire pCRTM4-TOPOTM avec les sites de restrictions entourant la zone d'insertion (adaptée du manuel technique pCRTM4-TOPOTM de Invitrogen).



Annexe 3 : Schéma du vecteur circulaire pTB207 avec les sites de restrictions XhoI et ApaI entourant la zone d'insertion. L'expression de la séquence insérée est contrôlée par le promoteur T7. Le 3'UTR de la β -globine de xénope permet la bonne reconnaissance des ARNc par le système de traduction de l'œuf de xénope.



Annexe 4 : Carte du vecteur circulaire pPD95.75



Annexe 5: Carte du vecteur circulaire pPD96.52

Annexe 6: Liste des communications orales

- ❖ **Macrocyclic lactones : activation of a new subtype of glutamate-gated chloride channels in *Parascaris* sp.**

Nicolas Lamassiaude, Cédric Neveu, Claude Charvet

¹ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

28th Annual Meeting of the German Society for Parasitology, Berlin, Allemagne, Mars 2018

Prix de la meilleure présentation orale

Abstract

Parascaris sp. is the largest nematode parasite of equids and is responsible for colic and death in foals through intestinal obstruction. Parasite control largely relies on the use of anthelmintics including ivermectin and moxidectin that act on glutamate-gated chloride channels (GluCls). However, *Parascaris* sp. resistance to macrocyclic lactones is a growing issue over the recent years throughout the world. Moreover, the GluCls of *Parascaris* sp. targeted by macrocyclic lactones are unknown. Here we identified and cloned the cDNAs of *Peq-avr-14b* and *Peq-glc-2* encoding two GluCl subunits and investigated them at the functional level.

The subunits Peq-AVR-14B and Peq-GLC-2 were expressed singly and in combination in *Xenopus laevis* oocytes to explore their function and pharmacology. Two-electrode voltage clamp recordings showed that each subunit could not form an homomeric channel. Interestingly, we have found that the co-expression of Peq-AVR-14B and Peq-GLC-2 led to a novel functional GluCl subtype. Moreover, we demonstrated that moxidectin and ivermectin were more potent agonists than glutamate. We also detected a SNP in the *Peq-avr-14b* gene from ivermectin-resistant worms that may encode a truncated form of the subunit. Its functional relevance in ivermectin resistance is in progress.

Here we report the functional characterisation of the first moxidectin/ivermectin-sensitive GluCl of *Parascaris* sp., thus opening the way for better understanding the mode of action of macrocyclic lactones and resistance mechanisms in ascarids.

Keywords: *glutamate-gated chloride channel, Parascaris sp., AVR-14b, GLC-2, Xenopus oocytes, macrocyclic lactones, moxidectin, ivermectin*

❖ **First functional characterization of a GABA receptor from the body louse *Pediculus humanus corporis***

Nicolas Lamassiaude¹, Claude Charvet¹, Cédric Neveu¹, Berthine Toubate², Françoise Debière-Grockieo²,
Isabelle Dimier-Poisson²

¹ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

²ISP, UFR de Pharmacie, Université Tours, UMR1282, 37200, Tours, France

6th International Conference on Phthiraptera, Brno, République Tchèque, Juin 2018

Abstract

Control of infestation by cosmopolitan lice (*Pediculus humanus*) is increasingly difficult due to the transmission of resistant parasites. Ligand gated ion channels are the major pharmacological targets of pediculicides including pyrethrins, malathion, spinosad and ivermectin (also used as nematocide and acaricide) but targets of these molecules remain largely unknown in lice. Among those receptors present in the nervous system, γ -aminobutyric acid gated chloride ion channels (GABACl) are the main synaptic inhibitory receptors in insects, making them pertinent pharmacological targets. In the present study, we identified and characterized the targets of insecticides in lice to decipher the mode of action of insecticides in *Pediculidae*.

Research in the genomic databases of *Pediculus humanus* allowed us to identify a GABACl subunit encoded by the *Resistance to dieldrin (Rdl)* gene. We cloned the corresponding full-length cDNA into a transcription vector and performed *in vitro* synthesis of the cRNAs, which were injected in the *Xenopus* oocytes system to reconstitute functional channels. Two-electrode voltage clamp recordings showed that Pcor-RDL assemble into a homomeric receptor sensitive to different insecticides like fipronil and picrotoxin. These results correlated with the efficacy of these drugs on lice *in vivo*.

In conclusion, we report the functional characterization of the first GABACl of *Pediculus humanus corporis*. These results contribute to our understanding of the mode of action of insecticide compounds and will allow the development of new strategies to control lice infestations.

❖ **Macrocyclic lactones : activation of a new subtype of glutamate-gated chloride channels in *Parascaris* sp.**

Nicolas Lamassiaude

ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

PhD day de l'unité Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France, Septembre 2019

Prix de la meilleure présentation orale

Abstract

Parascaris sp. is the largest nematode parasite of equids and is responsible for colic and death in foals through intestinal obstruction. Parasite control largely relies on the use of anthelmintics including ivermectin and moxidectin that act on glutamate-gated chloride channels (GluCl_s). However, *Parascaris* sp. resistance to macrocyclic lactones is a growing issue over the recent years throughout the world. Moreover, the GluCl_s of *Parascaris* sp. targeted by macrocyclic lactones are unknown. Here we identified and cloned the cDNAs of *Peq-avr-14b* and *Peq-glc-2* encoding two GluCl subunits and investigated them at the functional level.

The subunits Peq-AVR-14B and Peq-GLC-2 were expressed singly and in combination in *Xenopus laevis* oocytes to explore their function and pharmacology. Two-electrode voltage clamp recordings showed that each subunit could not form a homomeric channel. Interestingly, we have found that the co-expression of Peq-AVR-14B and Peq-GLC-2 led to a novel functional GluCl subtype. Moreover, we demonstrated that moxidectin and ivermectin were more potent agonists than glutamate. We also detected a SNP in the *Peq-avr-14b* gene from ivermectin-resistant worms that may encode a truncated form of the subunit. Its functional relevance in ivermectin resistance is in progress.

Here we report the functional characterisation of the first moxidectin/ivermectin-sensitive GluCl of *Parascaris* sp., thus opening the way for better understanding the mode of action of macrocyclic lactones and resistance mechanisms in ascarids.

Keywords: glutamate-gated chloride channel, *Parascaris* sp., AVR-14b, GLC-2, *Xenopus* oocytes, macrocyclic lactones, moxidectin, ivermectin

❖ **First insight into the characterisation of ivermectin-sensitive receptors in the human lice *Pediculus humanus humanus***

Nicolas Lamassiaude¹, Berthine Toubate², Cédric Neveu¹, Françoise Debière-Grockiego², Isabelle Dimier-Poisson² and Claude Charvet¹

¹ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

²ISP, UFR de Pharmacie, Université Tours, UMR1282, 37200, Tours, France

20th Club of Invertebrate Neurobiology, Orléans, France, Mai 2019

Abstract

The increasing prevalence of human parasites, combined with the spread of drug resistance are major challenges for our modern societies. The cosmopolitan lice (*Pediculus humanus*) developed resistance to commonly used pediculicides even for ivermectin which is already marketed to treat human lice infestation. Ivermectin is widely used to fight against helminth endoparasites as well as ectoparasites and insect pests. In other insects like *Apis mellifera* or *Drosophila melanogaster*, ivermectin acts on glutamate-gated chloride channels (GluCl_s) in the nervous system of invertebrates. However, the mode of action of ivermectin in lice has not been described yet. Furthermore, a report of the presence of GluCl mutations detected in clinical ivermectin-resistant head lice was published in 2018.

In the present study, we characterised the target of ivermectin in lice to decipher the mode of action of insecticides in *Pediculidae*. Research in the genomic databases of *Pediculus humanus* allowed us to identify two GluCl subunit sequences. We cloned the corresponding full-length cDNAs into a transcription vector and performed *in vitro* synthesis of the cRNAs, which were injected in the *Xenopus* oocyte expression system to reconstitute functional channels. Two-electrode voltage-clamp recordings showed that the Phh-GluCl1 subunit assembles into a homomeric receptor sensitive to glutamate whereas the Phh-GluCl2 never gave rise to functional channels. Moreover, ivermectin was found to be a non-competitive agonist which is consistent with the pharmacology observed in others insects. These results correlated with the efficacy of these drugs on lice *in vivo*.

In conclusion, we report the first functional characterisation of the GluCl of *Pediculus humanus humanus*. These results contribute to our understanding of the mode of action of ivermectin as well as the pharmacology of GluCl_s.

❖ **Lotilaner is a potent inhibitor of the novel GABA receptor of body lice *Pediculus humanus humanus***

Nicolas Lamassiaude¹, Berthine Toubate², Pierre Charnet³, Cédric Neveu¹, Françoise Debière-Grockieo², Claude Charvet¹ and Isabelle Dimier-Poisson²

¹ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

²ISP, UFR de Pharmacie, Université Tours, UMR1282, 37200, Tours, France

³Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), CNRS UMR 5247, Place Eugene Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France

27th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Madison, USA, Juillet 2019

Abstract

Drug resistance in the parasites field, including the cosmopolitan lice (*Pediculus humanus*), and the prevalence increasing despite the marketing of new therapies are an important challenge for our societies. The major pharmacological targets of insecticides like pyrethrins, malathion, spinosad and ivermectin (also used as nematocide and acaricide) are the ligand gated ion channels present in the nervous system of insects. Currently, targets of these molecules remain largely unknown in body lice. Among those channels receptors, γ -aminobutyric acid gated chloride ion channels (GABACl) are the main synaptic inhibitory receptors in insects, making them pertinent pharmacological targets.

In the present study, we identified and characterized the targets of insecticides in lice to decipher the mode of action of insecticides in *Pediculidae*. Research in the genomic databases of *Pediculus humanus* allowed us to identify a GABACl subunit encoded by the *Resistance to dieldrin (Rdl)* gene. We cloned the corresponding full-length cDNA into a transcription vector and performed *in vitro* synthesis of the cRNAs, which were injected in the *Xenopus* oocytes system to reconstitute functional channels. Two-electrode voltage clamp recordings showed that Phh-RDL assemble into a homomeric receptor sensitive to different insecticides like fipronil, picrotoxin and lotilaner, a novel class of ectoparasiticide agent using to treat ticks and fleas of dogs (Credelio™, Elanco). These results correlated with the efficacy of these drugs on lice *in vivo*.

In conclusion, we report the functional characterization of the first GABACl of *Pediculus humanus humanus*. These results contribute to our understanding of the mode of action of insecticide compounds and will allow the development of new therapeutic strategies to control lice infestations.

❖ **Effect of macrocyclic lactones on *Parascaris sp.* glutamate-gated chloride channels**

Nicolas Lamassiaude¹, Elise Courtot¹, Cédric Neveu¹ and Claude L. Charvet¹

¹ ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

27th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Madison, USA, Juillet 2019

Prix de la meilleure communication orale

Abstract

Parascaris sp. is the largest parasitic nematode of horse causing digestive and respiratory disorders to the animal. The control of equine ascaridiosis relies on anthelmintic treatments including macrocyclic lactones (MLs) as the gold standard. However, control of infestation is increasingly difficult due to the emergence of resistant parasites throughout the world. In the free-living model nematode *Caenorhabditis elegans*, glutamate-dependent chloride channel receptors (GluCl_s) were identified as the main targets of MLs. However, in *Parascaris sp.*, the mode of action of MLs remain poorly understood. Here we identified the *Parascaris sp.* GluCl_s and characterized the effect of a wide range of MLs.

Using a candidate gene approach, we identified the orthologs of 6 genes encoding GluCl_s subunits in *Parascaris sp.* The complete cDNAs encoding these subunits were amplified by PCR and cloned into a transcription vector. The corresponding cRNAs were synthesized *in vitro* and then microinjected into *Xenopus laevis* oocytes. Two-electrode voltage-clamp experiments were performed on recombinant GluCl_s to investigate their pharmacological properties. Thus, the expression of a single subunit and combination of different subunits in *Xenopus* oocytes allowed us to obtain the functional homeric and heteromeric GluCl_s of *Parascaris sp.* The receptors were both sensitive to glutamate and ivermectin but the effect of seven different ML compounds revealed striking differences. The physiological function and the impact of MLs on these receptors *in vivo* are in progress.

This study, provides a better understanding of the pharmacology of GluCl_s as well as the mode of action of MLs in nematode parasites.

❖ **Functional characterization reveals preferential molecular targets of macrocyclic lactones in the horse nematode parasite *Parascaris sp.***

Nicolas Lamassiaude

ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

PhD day de l'unité Infectiologie et Santé Publique, Nouzilly, France, Septembre 2019

Abstract

Parascaris sp. is the largest nematode parasite of horses and is responsible of equine ascaridiosis causing digestive and respiratory disorders to the animal. The fight against gastro-intestinal nematodes relies on anthelmintic treatments including macrocyclic lactones which are massively used worldwide to control human and veterinary parasites. However, control of infestation is increasingly difficult due to the emergence of resistant parasites throughout the world. The main targets of macrocyclic lactones in insects and nematodes have been identified as glutamate-gated chloride channel receptors (GluCl). However, in *Parascaris sp.*, the mechanisms of action of macrocyclic lactones and the mechanisms of resistance remain largely unknown.

First, using a candidate gene approach, we identified the orthologs of 5 genes encoding 6 GluCl subunits in *Parascaris sp.* The cDNAs of these subunits were amplified by PCR and cloned into a transcription vector. The corresponding cRNAs were synthesized *in vitro* and then microinjected into *Xenopus laevis* oocytes. This heterologous expression system is a powerful tool to study the composition and the pharmacology of recombinant receptors by recording currents after application of drugs (macrocyclic lactones) by two-electrode voltage-clamp. Thus, expression of the subunit singly or in combination in the *xenopus* oocytes allowed us to obtain the first functional characterization of homeric and new heteromeric GluCl subtypes of *Parascaris sp.* All receptors identified are sensitive to glutamate but showed different affinity for macrocyclic lactones applied (ivermectin, moxidectin, selamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin and abamectin). The physiological function and the impact of macrocyclic lactones on these receptors *in vivo* are in progress.

In this study, we show the first functional characterization of *Parascaris sp.* GluCl subtypes sensitive to macrocyclic lactones. This research provides a better understanding of the pharmacology of GluCl subtypes as well as the mode of action of macrocyclic lactones.

Keywords : Glutamate gated chloride channel (GluCl), macrocyclic lactones, ivermectin, moxidectin, *Parascaris sp.*

❖ **Effets des lactones macrocycliques sur les canaux chlorure glutamate dépendant du nématode parasite du cheval *Parascaris sp.***

Nicolas Lamassiaude¹, Elise Courtot¹, Cédric Neveu¹ et Claude L. Charvet¹

¹ ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

32^e colloque BiotechnoCentre, Seillac, France, Octobre 2019

Abstract

Parascaris sp. est le plus grand nématode parasite des équins (chevaux, ânes, poneys...) et est responsable de l'ascaridiose équine. Cette maladie se traduit par des troubles digestifs et respiratoires chez l'animal pouvant conduire à sa mort. Le contrôle de ce parasite repose essentiellement sur l'utilisation d'anthelminthiques tels que les lactones macrocycliques (MLs). Cependant, le contrôle de l'infestation est de plus en plus difficile en raison de l'émergence de parasites résistants à travers le monde. Chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*, les récepteurs canaux chlorure glutamate-dépendants (GluCl) ont été identifiés comme étant les cibles principales des MLs. Toutefois, chez *Parascaris sp.*, le mode d'action des MLs reste largement méconnu. Dans cette étude, nous avons identifié les GluCl de *Parascaris sp.* et caractérisé l'effet d'une large gamme de MLs.

En utilisant une approche de type gène-candidat, nous avons identifié les orthologues de 6 gènes codant pour des sous-unités de GluCl chez *Parascaris sp.* Les ADNc codant pour ces sous-unités ont été amplifiés par PCR et clonés dans un vecteur de transcription. Les ARNc correspondants ont été synthétisés *in vitro* puis microinjectés dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Des expériences de « two-electrode voltage-clamp » ont été effectuées sur des GluCl recombinants afin d'étudier leurs propriétés pharmacologiques. Ainsi, l'expression d'une seule sous-unité et la combinaison de différentes sous-unités dans les ovocytes de xénope nous ont permis d'obtenir les GluCl homériques et hétéromériques fonctionnels de *Parascaris sp.* Les récepteurs étaient sensibles au glutamate et à l'ivermectine, mais présentaient des sensibilités très différentes face aux autres MLs appliquées. L'étude des fonctions physiologiques et l'impact des MLs sur ces récepteurs *in vivo* est en cours.

Cette étude fournit une meilleure compréhension de la pharmacologie des GluCl ainsi que du mode d'action des lactones macrocycliques chez les nématodes parasites.

Mots-clés : *Parascaris sp.*, récepteurs canaux chlorure glutamate-dépendant, lactones macrocycliques, ivermectine, ovocytes de *Xenopus laevis*

Annexe 7: Liste des posters

Caractérisation fonctionnelle des cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques chez le nématode parasite du cheval *Parascaris equorum*

Nicolas Lamassiaude, Cédric Neveu, Claude Charvet

ISP, INRA, Université Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

Journées d'Animation du département de Santé Animal, Nantes, France, Octobre 2018

Functional characterisation of the macrocyclic lactones pharmacological targets from the horse nematode parasite *Parascaris sp.*

Nicolas Lamassiaude, Cédric Neveu, Claude Charvet

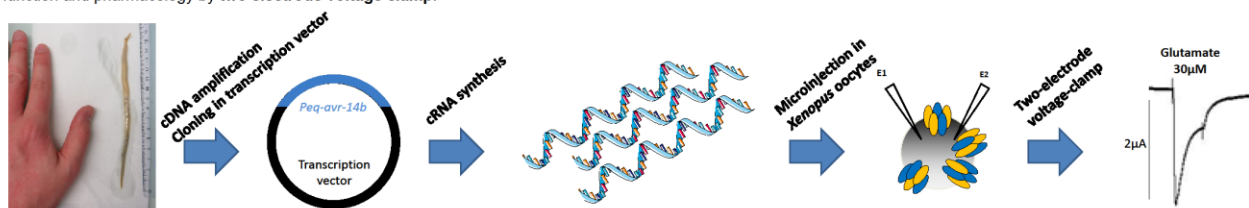
ISP, INRA, Université de Tours, UMR1282, 37380, Nouzilly, France

Parascaris sp. is the largest nematode parasite of equids and is responsible for colic and death in foals through intestinal obstruction. Parasite control largely relies on the use of anthelmintics including macrocyclic lactones (MLs), like ivermectin and moxidectin, which are also used as acaricides and insecticides. Previously, the MLs targets in mammals, insects and nematodes have been identified principally as glutamate-gated chloride channels (GluCl) and secondarily as γ -aminobutyric acid receptors. However, *Parascaris sp.* resistance to macrocyclic lactones has been a growing issue over the recent years all over the world. Moreover, the GluCl of *Parascaris sp.* targeted by macrocyclic lactones are unknown.

Objectives:

- Identification of *Parascaris* GluCl gene
- Functional characterisation of these receptors

Method: using a candidate gene approach, 6 orthologous genes coding *Parascaris* GluCl subunits were identified: *avr-14a*, *avr-14b*, *glc-2*, *glc-3*, *glc-4* and *glc-5*. These subunits were cloned in a transcription vector in order to synthesise cRNA *in vitro*. Then, the subunits were expressed singly and in combination in *Xenopus laevis* oocytes to explore their function and pharmacology by **two electrode voltage clamp**.



Functional characterisation of *Parascaris* glutamate receptors

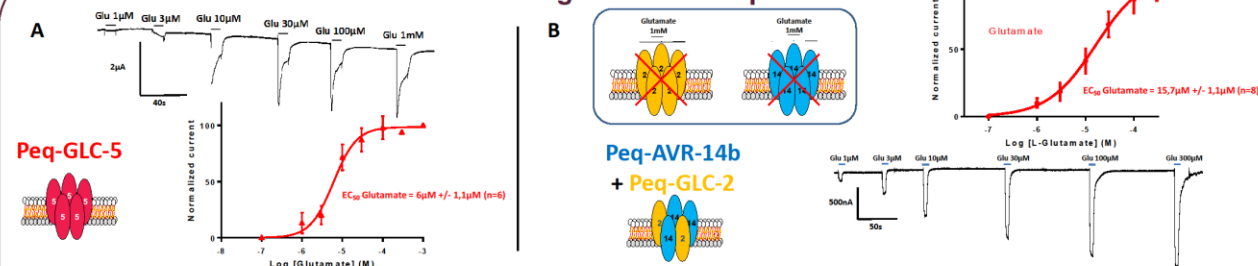


Fig. 1: Two-electrode voltage-clamp recording of *Xenopus laevis* oocytes expressing Peq-GLC-5 singly or Peq-AVR-14b and Peq-GLC-2 in combination (recording traces and glutamate dose-response relationship). Peq-GLC-5 forms a functional homomeric receptor with a strong affinity for glutamate (EC_{50} Glutamate = $6 \mu M \pm 1.1 \mu M$ n=6) (A). Peq-AVR-14b and Peq-GLC-2 are not able to form functional homomeric receptors but the combination Peq-AVR-14b/GLC-2 displays a high glutamate affinity (EC_{50} Glutamate = $15.7 \mu M \pm 1.1 \mu M$ n=8) (B).

Peq-GLC-5 and Peq-AVR-14b/GLC-2 present similar biophysical properties

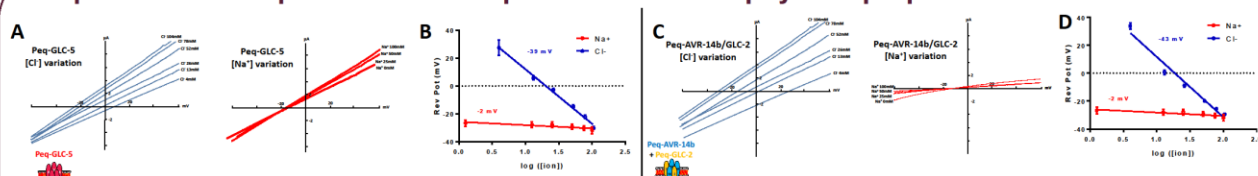


Fig. 2: Ion selectivity of Peq-GluCl subunits. A voltage-ramp protocol is used to obtain current-voltage curves for a Peq-GLC-5 (A) or Peq-AVR-14b/GLC-2 (C) expressing oocyte after application of increasing concentration of either Na^+ and Cl^- . Na^+ ion are replaced with TAECI (Na^+ -free Ringer's solution) for Na^+ permeability and Cl^- ion are replaced with sodium-acetate for Cl^- permeability. Dilutions of Ringer solution with varying concentration of Na^+ (0 mM, 12.5 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM and 100 mM) and Cl^- (4 mM, 13 mM, 26 mM, 52 mM, 78 mM and 104 mM) enabled to measure the reversal potential of these receptors on each Cl^- or Na^+ concentration. Reverse potential ion concentration relation with Na^+/Cl^- dilution: the shift in reversal potential when using varying concentration of Cl^- indicate that Peq-GLC-5 (B) and Peq-AVR-14b/GLC-2 (D) are chloride selective receptors.

Peq-GLC-5 and Peq-AVR-14b/GLC-2 are sensitive to a wide range of macrocyclic lactones

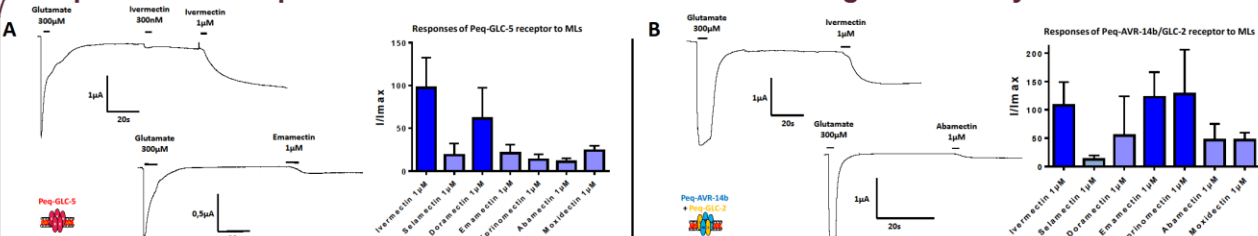


Fig. 3: Pharmacological profile of GluCl receptors for macrocyclic lactones. Affinity of GluCl receptors for macrocyclic lactones depends on the subunit composition of each receptor. Ivermectin is the most potent activator of Peq-GLC-5 (A) whereas ivermectin, emamectin and eprinomectin are the most effective MLs on Peq-AVR-14b/GLC-2 (B). Affinities of these two receptors for MLs are higher than for the natural ligand Glutamate.

Annexe 8: Rédaction d'un article de vulgarisation scientifique pour le site du département de Santé Animal de l'INRAE (Ma thèse en 3500 signes)

Lutte contre le parasitisme équin : de nouvelles cibles thérapeutiques en cours d'identification

Les parasitoses causées par les vers parasites des équidés (poneys, chevaux, ânes...) ont un impact sévère sur la production et l'élevage équins. L'apparition de parasites résistants aux molécules chimiques rend inefficace certains traitements à l'échelle mondiale. Pour mieux lutter contre ces parasites, les chercheurs de l'unité ISP¹ étudient les mécanismes de résistance à l'aide de techniques originales.



Parascaris sp. : un ver parasite présent dans le monde entier

La parasitose liée au ver parasite du cheval (*Parascaris sp.*) est classée par l'ANSES² parmi les dix maladies les plus préoccupantes pour la filière équine. Elle entraîne des baisses de performance chez les chevaux et des amaigrissements avec un retard de croissance chez les poulains. Seules trois familles de molécules chimiques, parmi lesquelles l'ivermectine est la plus utilisée, sont disponibles pour tuer le parasite. Cependant, des parasites résistants à ces trois familles de molécules ont été observés, notamment en France. Pour mieux lutter contre *Parascaris sp.*, des chercheurs de l'unité ISP¹ étudient ces phénomènes de résistances. Quelles sont les cibles de l'ivermectine chez ce parasite et son mode d'action? Comment fonctionne la résistance ?



Les récepteurs du système nerveux des parasites : des cibles thérapeutiques majeures

Pour étudier les vers parasites, *Caenorhabditis elegans* est un modèle souvent utilisé. En effet, ce ver est facile à manipuler, il permet de générer de nombreux résultats, contrairement aux vers parasites. Chez ce ver non parasite, l'ivermectine agit sur des récepteurs présents dans son système nerveux. Ces récepteurs sont des protéines - véritables canaux- qui permettent la transmission d'un message nerveux. Lorsqu'ils sont activés, le message envoyé provoque l'arrêt de fonctions biologiques essentielles (mouvement, alimentation, etc). Chez *C. elegans*, ces récepteurs sont composés de cinq sous-unités protéiques, comme les cinq doigts de la main. Si vous rapprochez les sous-unités, vous fermez le récepteur : il n'est pas activé et le ver vit tranquillement dans le cheval. Si vous éloignez les sous-unités, le récepteur s'ouvre. Il devient alors activé et le ver perd son tonus musculaire et meurt. C'est ce qui se produit avec l'ivermectine. En se fixant de façon irréversible sur le récepteur, elle déclenche l'ouverture du canal induisant la paralysie flasque (ou décontraction totale) et la mort du ver.

Identification des cibles de l'ivermectine chez le parasite équin...

En se basant sur les connaissances acquises sur le ver modèle *C. elegans*, les chercheurs de l'unité ISP¹ sont parvenus à identifier 6 sous-unités constitutives des récepteurs du ver équin : cinq sont similaires à celles de *C. elegans* et une lui est spécifique.

Les chercheurs ont ensuite réalisé des assemblages de 5 sous-unités parmi les 6 identifiées, afin d'étudier les récepteurs de *Parascaris sp.* ainsi reconstitués. La fonctionnalité et la pharmacologie de ces récepteurs ont été caractérisées grâce à un outil particulier... l'œuf de la grenouille Sud-Africaine *Xenopus laevis* (cf encadré). La sensibilité d'un récepteur vis-à-vis de drogues dépend en effet de sa composition en sous-unités. Trois récepteurs sensibles à l'ivermectine ont ainsi été identifiés chez *Parascaris sp.*

Les chercheurs continuent leurs investigations sur le rôle de ces récepteurs dans la physiologie du parasite. A quel organe ou à quelle fonction biologique sont-ils associés ? A quel stade de développement sont-ils exprimés ? Les récepteurs de parasites sensibles à l'ivermectine sont-ils différents des récepteurs de parasites résistants ? Si oui, quelles sont ces différences ?

...pour des applications concrètes pour la filière équine

Les travaux des chercheurs devraient apporter de nouvelles connaissances sur les cibles, les mécanismes de résistances et le mode d'action de l'ivermectine chez le ver parasite équin. A terme, ils pourraient contribuer au développement de tests de diagnostic de la résistance des vers. Ces tests permettraient d'adapter les traitements pour défendre les chevaux et les poneys contre *Parascaris sp.*

Ces recherches bénéficient d'un cofinancement de l'INRA et de la région Centre-Val de Loire.

1 : Unité d'Infectiologie et de Santé Publique

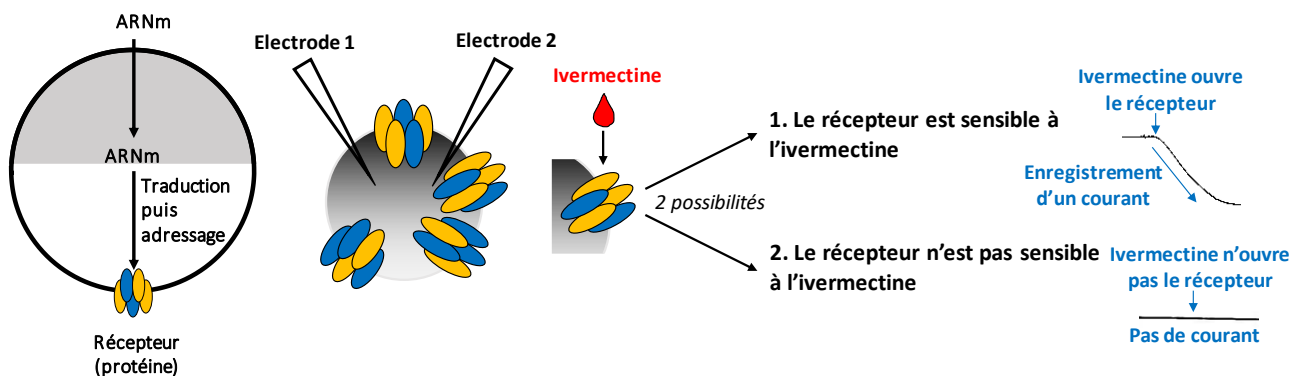
2 : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (<https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-l%E2%80%99anses-relatif-%C3%A0-la-hi%C3%A9rarchisation-de-103-maladies-animales-pr%C3%A9sentes-0>)

Mots clés : santé animale, ver parasite, ivermectine, cheval, récepteurs protéiques

<http://www.sa.inra.fr/Toutes-les-actualites/MT-3500-signes-Lutte-contre-le-parasitisme-equin-de-nouvelles-cibles-therapeutiques-en-cours-d-identification>

Encadré : EN SAVOIR PLUS

Electrophysiologie en œuf de xénope



L'œuf de la grenouille africaine *Xenopus laevis* est un outil original permettant, entre autre, l'expression à la surface de l'œuf de récepteurs protéiques se trouvant à la surface des cellules animales et végétales. Couplé à l'électrophysiologie, cet outil est utilisé par les chercheurs pour étudier la fonctionnalité et la pharmacologie des récepteurs.

Comment cela fonctionne-t-il ? Les ARN messagers (ARNm : intermédiaire entre ADN et protéine) des sous-unités protéiques des récepteurs sont injectés seuls ou en combinaison dans les œufs de xénope. Après quelques jours, les ARNm se traduisent en protéines ; et les récepteurs protéiques s'expriment à la membrane de l'œuf. S'ils sont fonctionnels et sensibles, l'application d'ivermectine déclenche l'ouverture des récepteurs qui laissent passer des ions. Cet échange d'ions entre l'extérieur et l'intérieur de l'œuf génère un courant électrique enregistrable par deux électrodes. Si aucun courant n'est enregistré suite à l'application d'ivermectine, c'est que les récepteurs ne sont pas fonctionnels ni sensibles. Cette technique permet également de mettre en évidence les récepteurs devenus insensibles à l'ivermectine (suite à des mutations), à l'origine de la résistance du parasite.

Encadré : A PROPOS DE

Nicolas Lamassiaude, rédacteur de cette actualité, est lauréat régional de l'édition 2019 du concours « Ma thèse en 180s ». Les candidats disposent de 3 minutes pour présenter oralement leurs recherches, avec une seule diapositive et sans notes. Ce concours de communication est organisé nationalement par la Conférence des Présidents d'Universités et le CNRS. Nicolas a remporté le « 1^{er} prix du jury » pour la région Centre Val de Loire (<https://www.youtube.com/watch?v=xr3SbeankUQ>). Il a également reçu le 1^{er} prix de la meilleure communication orale au congrès de la WAAVP (27th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) qui s'est tenue à Madison (Etats-Unis) du 7 au 11 juillet 2019 (<http://www.waavp2019.com/>, https://www.facebook.com/pg/WAAVP2019/photos/?ref=page_internal).

Ce projet de recherche est effectué dans le cadre de sa thèse de doctorat qu'il prépare dans l'unité ISP¹, au sein de l'équipe « **Multirésistances et pouvoir Pathogène des Nématodes** ». **Sa thèse s'intitule : « Identification et caractérisation fonctionnelle des cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques chez le nématode parasite du cheval *Parascaris sp.* ».** Nicolas est doctorant en deuxième année à l'Ecole doctorale Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) rattachée à l'Université de Tours. Sa thèse est cofinancée par l'INRA et la Région Centre Val de Loire.

Identification et caractérisation fonctionnelle

des cibles pharmacologiques des lactones macrocycliques des invertébrés

Résumé

Parmi la grande variété des espèces d'invertébrés parasites, le contrôle de la majorité d'entre elles passe par l'utilisation d'antiparasitaires tels que les lactones macrocycliques (MLs) et les isoxazolines. Cependant, l'émergence de parasites résistants à travers le monde rend la compréhension du mode d'action des antiparasitaires ainsi que l'identification de leurs cibles pharmacologiques nécessaires pour adapter les stratégies de lutte. Dans ce contexte, en utilisant une approche gène candidat, nous avons identifié les sous-unités codant les récepteurs au glutamate GluCl (*avr-14*, *avr-15*, *glc-1*, *glc-2*, *glc-3*, *glc-4* et *glc-5*) des nématodes *Caenorhabditis elegans*, *Brugia malayi* et *Parascaris univalens*, ainsi que les récepteurs au glutamate (*GluCl*) et au GABA (*rdl*) du pou de corps humain *Pediculus humanus humanus*. L'expression hétérologue de ces sous-unités en œufs de xénope a permis d'identifier de nouveaux sous-types de GluCl et de caractériser le mode d'action des MLs chez les trois espèces de nématodes. Chez *C. elegans*, AVR-14B, GLC-2 et GLC-3 forment des récepteurs homomériques fonctionnels mais pas chez les nématodes parasites. Chez les trois espèces, AVR-14B et GLC-2 s'associent pour former des récepteurs sensibles aux MLs tandis que GLC-2 et GLC-3 ne s'associent que chez *C. elegans* et *P. univalens*. GLC-2/GLC-3 de *P. univalens* présente des propriétés pharmacologiques originales. Chez le pou humain, des tests de toxicité ont mis en évidence l'effet pédiculicide des MLs et des isoxalines et l'expression des sous-unités de canaux ioniques en œufs de xénope a permis de déterminer leur mode d'action préférentiel sur les GluCl et les récepteurs au GABA. La caractérisation de ces récepteurs est une première étape pour le développement de nouveaux antiparasitaires et pour le développement de nouvelles stratégies de lutte.

Mots-clés : canaux chlorure glutamate-dépendant, invertébrés, lactones macrocycliques, isoxazolines, œufs de xénope

Summary

Invertebrates include a wide variety of parasites of human and animal interest. The control of parasites relies on antiparasitic treatment such as macrocyclic lactones (MLs) and isoxazolines. However, emergence of resistant parasites worldwide makes the investigation of the antiparasitic mode of action as well as their pharmacological targets necessary to move forward the actual control strategies. In this context, using a candidate gene approach, we identified the subunits encoding glutamate-gated chloride channels GluCl (*avr-14*, *avr-15*, *glc-1*, *glc-2*, *glc-3*, *glc-4* and *glc-5*) in the nematodes *Caenorhabditis elegans*, *Brugia malayi* and *Parascaris univalens*, as well as GluCl and GABA receptors (*rdl*) of the human body louse *Pediculus humanus*. The heterologous expression of subunits in xenopus oocytes allowed the identification of new GluCl subtypes and the characterisation of the mode of action of MLs in these three nematodes species. For *C. elegans*, AVR-14B, GLC-2 and GLC-3 form functional homomeric receptors but not for parasitic nematodes. For the three species, AVR-14B and GLC-2 combine to form receptors sensitive to MLs whereas GLC-2 and GLC-3 only combine for *C. elegans* and *P. univalens*. GLC-2/GLC-3 of *P. univalens* shows original pharmacological properties. For the human louse, toxicity tests demonstrated the pediculicidal effect of MLs and isoxazolines and the expression of ion channel subunits in *Xenopus* oocytes elucidate their preferential mode of action on GluCl and GABA receptors. The characterisation of these receptors is a first step for the development of new antiparasitic drugs and new control strategies.

Key words: glutamate-gated chloride channel, invertebrates, macrocyclic lactones, isoxazolines, xenopus oocytes