



HAL
open science

Impact de l'ivermectine sur les systèmes de détoxification des xénobiotiques : régulations chez l'hôte et chez le nématode

Mélanie Alberich

► **To cite this version:**

Mélanie Alberich. Impact de l'ivermectine sur les systèmes de détoxification des xénobiotiques : régulations chez l'hôte et chez le nématode. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2014. Français. NNT : 2014INPT0102 . tel-04169612v2

HAL Id: tel-04169612

<https://hal.inrae.fr/tel-04169612v2>

Submitted on 26 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme MÉLANIE ALBERICH

le mardi 16 décembre 2014

Titre :

IMPACT DE L'IVERMECTINE SUR LES SYSTEMES DE
DETOXIFICATION DES XENOBIOTIQUES: REGULATION CHEZ L'HOTE
ET CHEZ LE NEMATODE.

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

INRA Toxalim UMR 1331, Equipe Transporteurs Membranaires et Résistance

Directeur(s) de Thèse :

MME ANNE LESPINE

MME CECILE MENEZ-BERLIOZ

Rapporteurs :

M. JACQUES CABARET, INRA TOURS

Mme FRANCOISE VAN BAMBEKE, UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN

Membre(s) du jury :

M. ALEXIS VALENTIN, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Président

Mme ANNE LESPINE, INRA TOULOUSE, Membre

Mme CECILE MENEZ-BERLIOZ, INRA TOULOUSE, Membre

M. ROGER PRICHARD, MCGILL UNIVERSITY MONTREAL, Membre

Mes remerciements s'adressent tout d'abord aux membres du jury,

Je remercie vivement le Professeur **Alexis Valentin** pour avoir accepté de présider le jury de soutenance de ce travail de doctorat.

J'adresse ma profonde reconnaissance au Professeur **Françoise Van Bambeke** ainsi qu'au Professeur **Jacques Cabaret** pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'avoir consacré de leur temps à la lecture et à l'évaluation de ce travail.

J'adresse toute ma gratitude au Professeur **Roger Prichard** pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail de doctorat.

Je remercie vivement mes directrices de thèse le Docteur **Anne Lespine** et le Docteur **Cécile Ménez-Berlioz**. Anne, merci de m'avoir ouvert les portes et accueillie dans ton laboratoire depuis le master. Cécile, merci de m'avoir encadrée durant ces quelques années. Merci à vous pour la préparation du concours qui m'a permis de faire cette thèse. Sans une telle préparation, il est certain que je n'aurais pas eu la bourse. Il s'en sera passé des choses pour chacune d'entre nous durant ces 3 ans et demi... Cela aura été une grande expérience de vie, autant professionnellement que personnellement.

Merci à tous les membres de l'équipe Transporteurs Membranaires et Résistance. **Jean-François**, pour l'aide technique mais surtout je vous remercie pour votre sympathie, votre oreille attentive, vos blagues et votre gourmandise... **Chantal** merci pour ton sourire toujours communicatif, pour ces discussions qui ont fait du bien et pour ces dégustations tannées très intéressantes... **Stéphane**, merci pour ta gentillesse et ton investissement tout au long de cette thèse. D'abord pour avoir accepté d'être membre de mon comité de thèse et ensuite pour les corrections du manuscrit. Merci pour tes encouragements qui font chaud au cœur. **Marion**, merci pour les rigolades et les évasions spirituelles. Cela m'a donné un grand bol d'air frais durant cette rédaction. Bon courage pour la suite de ta thèse... En cette fin de thèse, une grande pensée va pour toi **Alice**, ça aura été génial de partager cette moitié de thèse à tes côtés, ta gentillesse, ton professionnalisme... Ceux qui vont t'embaucher auront un ingénieur en or... T'es au top.

A **Bernard Salles** et **Claude Maranges**, je vous remercie vivement pour avoir fait avancer rapidement mon dossier lorsque cela s'est avéré nécessaire afin de continuer cette thèse.

A **Jeanette**, pour ton sourire et ton aide précieuse.

A **Joelle** et **Sarah**, merci pour votre disponibilité, votre gentillesse et vos sourires.

A **Vincent**, merci pour ton aide informatique et ta bonne humeur. Merci pour m'avoir fait sourire à chaque fois que t'es venu réparer quelque chose au bureau. Merci pour ton aide précieuse en cette fin de thèse...

Aux membres des plateformes, **Colette, Caro et Patrice**, merci pour votre bonne humeur! C'était sympa de passer des moments avec vous à l'animalerie. A **Yannick, Claire et Pascal**, merci pour l'aide précieuse que vous nous apportez tout au long des manip. Merci à vous tous pour votre gentillesse.

Aux membres de l'équipe TIM, **Hervé, Fred, Laurence, Séverine, Nicolas et Leila**. Un grand merci pour votre disponibilité, votre gentillesse et vos bons conseils. **Alex**, on repapotera, refera des restos et des magasins c'est sûr. **Marion**, dommage que tu ne sois arrivée que maintenant, ça aurait été sympa de partager des cafés ensemble.

A **Phillipe** pour ta gentillesse et tes bonjours qui me donnent chaque matin le sourire. **Joelle**, pour ta gentillesse, ta patience, les conversations que l'on a pu avoir vont me manquer c'est certain. A **Olivier**, pour m'avoir demandé régulièrement comment j'allais... A **Pascal** merci pour ta gentillesse et ton excellent patrimoine fromager... A **Joanna, Alix, Rhoda, Sabria**, merci les filles pour votre sourire et les quelques ragots... A **Dunkan**, pour m'avoir aidé à tout relier ce fameux vendredi après-midi. A tous, je vous souhaite le meilleur pour votre travail, votre thèse ou vos post doc mais surtout pour après...

Un grand merci à toi ma poulette, **Selma**. C'est certain cette thèse, tout ce cursus, n'aurait pas été le même sans toi. On se suit depuis tellement de temps maintenant. De cette aventure ressort une jolie amitié et un surnom « Tic&Tac »... Merci d'avoir toujours été là pour les délires, les choses plus sérieuses et tout le reste. Tu vas devoir continuer à me supporter, c'est certain.

Merci à toi **Elisabeth**, tu as toujours été de bons conseils et c'est toujours agréable de discuter avec toi. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite de ta thèse.

A **Laurence Huc** pour ta disponibilité et ton aide précieuse pour étudier NRF2.

A **Sandrine Ménard**, pour ta gentillesse et pour m'avoir dépané de TNF-alpha.

A **Isabelle Pinson**, pour ton aide technique précieuse et ta gentillesse.

Pour les anciens de Toxalim, **Patricia** j'ai adoré partager une partie de ma thèse à tes côtés. Les repas, le café, c'était vraiment sympa et j'en garde que des bons souvenirs. **Edwin**, parce que t'es quelqu'un de vraiment génial et j'ai autant adoré papoter que travailler avec toi...

Merci à **tous les autres membres de Toxalim** que je ne connais pas personnellement mais pour vos bonjours tous les jours lorsque l'on se croise dans les couloirs.

J'exprime mes sincères remerciements aux collaborateurs de l'équipe pour la richesse des échanges scientifiques et l'accueil qu'ils m'ont accordé. A **Hugo Aguilaniu** de l'ENS à Lyon pour les manip sur *C. elegans*, à **Hervé Hoste** de l'ENVT de Toulouse pour le travail sur les flavonoïdes, à **Guillaume Sallé** de l'INRA de Tours pour les échanges sur *H. contortus*, à **Claire Racaud** pour son aide précieuse sur NF- κ B, à **Dave Bartley** du Moredum Institute en Ecosse pour le LFIA sur *T. circumcincta* et à **Roger Prichard** de l'Université de Mc Gill au Canada pour tout son savoir.

A tous ceux qui me sont proches et chers,

Papa, maman, merci pour tout. Ce sont des paroles qui peuvent paraître banales mais si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous, à vos sacrifices. Aujourd'hui, par ce manuscrit et par cette soutenance, j'espère vous honorer. Tout ça, c'est le fruit de votre éducation, de votre patience et de votre amour. Sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci. Je vous aime.

A mon frère **Nicolas**, merci pour tout. Merci d'être là au quotidien. Prends soin de toi. Je t'aime. Je souhaite à toute ta petite famille d'être heureuse. **Elea**, marraine va te bichonner, prépare toi.

A **Mémé**, merci à toi d'avoir toujours été là. Je t'embrasse tendrement avec beaucoup d'amour.

A **tonton, tatie, Lola, Aurélie** et **Alex**. Merci à vous tous. A **Lilou**, marraine est fière de toi.

A mes **deux pépés**, j'aurai beaucoup aimé que vous soyez là pour partager ce moment... Je pense très souvent à vous.

A toute **ma belle-famille**. Merci à tous pour tout, merci de m'avoir accueillie les bras grands ouverts. Je suis heureuse de faire partie de vos vies.

A **Laure, Samu, Seb** et **Domi**, merci à vous pour cette jolie amitié saverdunoise.

A ma **Lisouille**, ma zouy, ma meilleure amie... Merci d'avoir toujours été là. Merci pour tout ma belle. Merci pour tous ces moments très agréables et cette belle amitié qui malgré la distance est toujours aussi forte.

A **toi**... Parce que sans toi, cela aurait été bien plus compliqué, bien plus fade. Merci de me soutenir au quotidien, merci de croire autant en moi. Merci par ton amour d'avoir supporté tout ça. Même les moments difficiles ont été simples... Quand on regarde derrière, on en aura vécu des choses. On a toute la vie devant nous maintenant pour confirmer et conforter ce qui paraît être une évidence. A nous les projets, à nous la vie... J'ai hâte !

A vous tous, un grand merci, je vous souhaite tout le meilleur. Soyez heureux, ayez une vie douce et agréable.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. LES LACTONES MACROCYCLIQUES ANTHELMINTIQUES	7
1.1. Les avermectines	10
1.2. Les milbémycines (Prichard et al. 2012)	11
1.3. Mécanisme d'action	11
1.4. Pharmacocinétique	12
1.5. Devenir des LMs dans l'organisme hôte	14
1.5.1. Les transporteurs ABC	14
1.5.2. Les cytochromes	19
2. LA RESISTANCE AUX LMs CHEZ LE NEMATODE : ROLE DES TRANSPORTEURS ABC	21
2.1. Définition de la résistance	21
2.2. Prévalence de la résistance aux LMs dans le monde	21
2.3. Mécanismes de la Résistance aux LMs	22
2.3.1. Mécanismes de résistance spécifique	22
2.3.2. Mécanismes de résistance non spécifiques	23
2.4. La résistance aux LMs et la surexpression des transporteurs ABC chez le nématode modèle <i>Caenorhabditis elegans</i>	31
2.4.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> : un nématode modèle dans l'étude de la résistance.	31
2.4.2. La résistance à l'ivermectine chez <i>C. elegans</i>	32
2.4.3. Effet de l'absence des gènes codant pour les transporteurs ABC sur la sensibilité aux LMs	33
2.5. La résistance aux LMs et la surexpression des transporteurs ABC chez les nématodes parasites	34
2.6. Autres évidences génétiques lors de résistance aux LMs	36
2.6.1. Dyf-7	36
2.6.2. Les miRNA	36
3. Mécanismes de régulation des transporteurs ABC	37
3.1. Régulations transcriptionnelles	37
3.1.1. Rôle des facteurs de transcription	37
3.1.2. Le dialogue complexe entre les différents facteurs de transcription	46
3.2. Régulations epigénétiques	48
3.3. Régulations post transcriptionnelles	48
3.4. Régulations traductionnelles et post traductionnelles	49
4. REGULATIONS DES TRANSPORTEURS ABC EN REPOSE AUX LMS	51
4.1. Transporteurs ABC régulés par les LMs	51
4.2. Mécanismes de régulation connus des transporteurs ABC en réponse aux LMs	52
5. OBJECTIFS DE LA THESE	53
TRAVAUX EXPERIMENTAUX	67
PARTIE 1	69
CHAPITRE 1	71
Etude des régulations de l'expression des gènes des systèmes de détoxification de l'ivermectine chez l'hôte	71
CHAPITRE 2	83

Etude des mécanismes de régulation transcriptionnels impliqués dans l'induction de l'expression d' <i>Abcb1a</i> et <i>Abcb1b</i> en réponse à l'ivermectine	83
CHAPITRE 3	103
<i>Le récepteur nucléaire NHR-A est impliqué dans la sensibilité et le développement de la résistance à l'ivermectine chez C. elegans</i>	103
PARTIE 2	123
CHAPITRE 4	129
Effets des flavonoïdes sur l'efficacité de l'ivermectine chez <i>C. elegans</i>	129
CHAPITRE 5	147
Effets de l'ivermectine aglycone sur l'efficacité de l'ivermectine chez <i>T. circumcincta</i>	147
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	159
CONCLUSION	187
TITLE AND SUMMARY	191
TITRE ET RESUME	193

Les travaux de cette thèse, ainsi que les travaux sur les thématiques de recherche des équipes auxquelles j'étais associée, ont fait l'objet des publications et communications suivantes.

Publications

Albérich, M., Ménez, C., Sutra, JF., Lespine, A. (2014). Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes in vitro and in vivo in mice. *Eur J Pharmacol.* 5;740:428-35.

Kotze, AC., Hunt, PW., Skuce, P., Von Samson-Himmelstjerna, G., Martin, RJ., Sager, H., Krüchen, J., Hodgkinson, J., Lespine, A., Jexi, AR., Gilleard, JS., Beech, RN., Wolstenholme, AJ., Demeler, J., Robertson, AP., Charvet, CL., Neveu, C., Kaminsky, R., Rufener, L., **Albérich, M.**, Ménez, C., Prichard, RK. 2014. 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.* In press.

Communications orales

Albérich M., Ménez C., Lespine A. 2014. Interaction des flavonoïdes et de l'ivermectine avec les transporteurs ABC. *Demi-journée des doctorants, Toulouse, France.*

Lespine A., **Albérich M.**, Ménez C. 2014. Symposium on Membrane on Channels in Helminth Parasites, Resistance and Site of Action for Anthelmintics. February 5-7. San Francisco, USA.

Lespine A., **Albérich M.**, Sutra JF, Lebrun C., Ménez C. 2014. Inhibiting drug transporters in order to increase the efficacy of anthelmintics International congress in parasitology ICOPA XIII. August 10-15, Mexico.

Lespine A., Sutra JF., Bartley D., **Albérich M.**, Prichard RK., Ménez C. 2013. Ivermectin-aglycone: A novel p-gp inhibitor to reverse macrocyclic lactone resistance. WAAVP conferences, August 26-29, Perth, Australia.

Albérich M., Ménez C., Lespine A. 2012. Chronic oral treatment with ivermectin increases expression of genes involved in drug disposition in mice. 10th French-Belgian ABC Meeting, October 19-20. Brussels, Belgium.

Communications sous forme de poster

Albérich M., Ménez C., Lespine A. 2012. Chronic administration of ivermectin leads to a decrease of its concentration in the host. 12th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, July 8-12, Noordwijkerhout, The Netherlands.

Liste des abréviations

ABA: Abamectine
ABC: ATP-Binding Cassette
ADME: Absorption, distribution, Métabolisme, Excrétion
AND: Acide Désoxyribonucléique
AR: Androstan receptor
ARN: Acide Ribonucléique
ATP: Adénosine triphosphate
AUC: Aire sous la courbe
BHE: Barrière hémato-encéphalique
CAR : Constitutive androstan receptor
C_{max} : Concentration maximale
CYP : Cytochrome P450
DOR : Doramectine
E_{max} : Effet maximal
EPR : Eprinomectine
ER : Estrogen receptor
FXR : Farnesoid X receptor
GABA : Acide gamma amino-butyrrique
GIN : Gasto Intestinal Nematode
GluCl: Canaux chlorures glutamate-dépendant
GR: Glucocorticoid receptor
h: heure
HPLC: High performance liquid chromatography
IC₅₀ : Concentration induisant 50 % de l'effet maximal
IVM : ivermectine
KO: knock-out
LBD: Ligand Binding Domain
LM: Lactone Macrocyclique
LXR: Liver X receptor
MDR: Multi-drug resistance
miRNA: MicroRNA
MRP: Multi-drug Resistance associated-Protein
MOX: Moxidectine
MR: Mineralocorticoid receptor

MRT: Mean residence time

NBD: Nucleotide Binding Domain

OMS: Organisation mondiale de la santé

PPAR : Peroxisome proliferator activated receptor

PR : Pregesterone receptor

PXR : Pregnane X receptor

SA : Santé animale

SEL : selamectine

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

$T_{1/2}$: Temps de demi vie

T_{max} : Temps maximal

TMD : Transmembran domain

TR :Thyroid hormone receptor

VDR : Vitamin D receptor

VSP : Valspodar

Liste des figures et des tableaux

Figures

Figure 1 : Filiation schématique des lactones macrocycliques anthelminthiques (LMs) : des bactéries du sol aux produits thérapeutiques	8
Figure 2 : Structure générale des lactones macrocycliques anthelminthiques	9
Figure 3 : Structure générale des avermectines B1A et B1B	9
Figure 4 : Structure chimique des avermectines	10
Figure 5 : Structure chimique des milbémycines	11
Figure 6 : Structure secondaire des transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2	15
Figure 7 : Arbre phylogénétique des « full » transporteurs ABC humains appartenant aux sous familles A, B et C	16
Figure 8 : Arbre phylogénétique des transporteurs ABCB dans 4 génomes eucaryotes : Homo sapiens (Hs), Caenorhabditis elegans (Ce), Drosophila melanogaster (Dm) et Saccharomyces cerevisiae (Sc)	26
Figure 9 : Arbre phylogénétique des transporteurs ABC des génomes de <i>C. elegans</i> (Cel) et de <i>H. contortus</i> (Hco)	28
Figure 10 : Structure générale des récepteurs nucléaires	37
Figure 11 : Régulation transcriptionnelle simplifiée des transporteurs ABC par les RNs	42
Figure 12 : Dialogue entre les différents facteurs de transcriptions connus pour réguler l'expression des transporteurs ABC d'efflux	47
Tableaux	
Tableau 1 : Paramètres pharmacocinétiques de l'ivermectine et de la moxidectine dans le plasma de différentes espèces animales en fonction des voies d'administrations	13
Tableau 2 : Principaux transporteurs ABC impliqués dans le phénotype MDR : Dénomination et localisation	17
Tableau 3 : Inventaire des transporteurs ABC d'efflux chez le nématode modèle <i>C. elegans</i> et les principaux helminthes parasites	25
Tableau 4 : Inventaire des études proposant les transporteurs ABC d'efflux comme marqueurs moléculaires de la résistance aux LMs chez les principaux nématodes gastro-intestinaux	30
Tableau 5 : Inventaire des études démontrant une surexpression des transporteurs ABC lors de résistance aux LMs chez les helminthes parasites.	35
Tableau 6 : Classification des récepteurs nucléaires de mammifères	39
Tableau 7 : Les RNs dans la régulation des transporteurs ABC d'efflux impliqués dans le phénotype MDR	43

INTRODUCTION GENERALE

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe « Transporteurs Membranaires et Résistances » de l'UMR1331 Toxalim, Centre de recherche en toxicologie alimentaire, sous la codirection de Anne Lespine et Cécile Ménez. Ce projet s'inscrit dans le schéma stratégique du département Santé Animale (SA). Le développement d'une gestion intégrée est une mission de ce département afin d'éviter l'inconvénient majeur de l'usage massif de médicaments, à savoir l'apparition de résistance chez les pathogènes. Cette thèse s'est alors inscrite dans le cadre général de la santé publique vétérinaire en réponse aux urgences sociétales en matière de thérapeutique durable en élevage.

Dans le but de nourrir plus de trois milliards d'individus dans les cinquante prochaines années, un projet d'agriculture global est pensé afin d'intensifier la production animale dans un contexte où les ressources naturelles diminuent (Herrero and Thornton, 2013). Un tel challenge peut être concevable en améliorant la santé des animaux. Dans ce contexte, les infections des animaux par les nématodes gastro-intestinaux est un frein majeur. Les maladies qui impactent économiquement le plus les agriculteurs sont celles causées par les nématodes gastro-intestinaux. En effet, les infections des ruminants par les helminthes empêchent une production efficace du bétail. On observe un impact sur la prise alimentaire, la croissance, le poids et la composition des carcasses, la production de laine, la fertilité ou encore la production de lait (Fitzpatrick, 2013). L'avènement d'antiparasitaires à large spectre dans les années 1960 a offert un moyen abordable et simple pour contrôler les nématodes gastro-intestinaux. Par conséquent, ces médicaments, et notamment les lactones macrocycliques anthelmintiques (LMs), sont devenus les piliers du traitement de ces parasites. De par une utilisation intensive, des résistances aux LMs chez les parasites gastro-intestinaux se sont développées au sein des élevages du monde entier mettant en péril l'efficacité thérapeutique de ces molécules (Kaplan and Vidyashankar, 2012). Le développement de nouveaux antiparasitaires est limité par le coût conséquent d'une telle procédure. De la découverte d'une molécule à sa mise sur le marché, il est estimé à environ 300 millions de dollars (Dickson and Gagnon, 2004). L'enjeu demeure alors dans l'optimisation de l'utilisation des molécules existantes. Il est donc urgent de limiter et de contrôler les résistances aux LMs afin de prolonger leur efficacité et de proscrire une éventuelle impasse thérapeutique qui serait désastreuse pour les éleveurs mais aussi pour le secteur alimentaire.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse sont, dans un premier temps, de nous permettre de mieux comprendre les interactions entre les LMs antiparasitaires et les acteurs moléculaires impliqués dans l'efficacité thérapeutique et le développement de résistance, tel que les transporteurs ABC multidrogues et les cytochromes, chez l'hôte mais aussi chez le

parasite cible. Par la suite, des associations thérapeutiques d'intérêt sont recherchées afin de potentialiser l'efficacité de l'ivermectine chez le nématode.

Ce manuscrit comporte deux volets. Dans un premier **volet bibliographique**, nous nous consacrerons dans un premier temps à la description des lactones macrocycliques anthelminthiques et des mécanismes de résistance à ces molécules observées sur des nématodes. Nous aborderons ensuite, plus en détail, l'implication des transporteurs ABC d'efflux dans la résistance des nématodes aux LMs. Nous ferons le point sur les différents mécanismes généraux connus des régulations de ces transporteurs. Enfin, un état des lieux de l'influence des LMs sur l'expression de ces transporteurs sera réalisé. Le second **volet expérimental**, composé de 5 chapitres divisés en 2 parties, présente les études réalisées au cours de cette thèse chez l'hôte et chez le nématode. La première partie est composée de trois chapitres. Le **chapitre 1** évalue les effets d'une exposition à l'ivermectine chez la souris sur l'expression des gènes impliqués dans sa métabolisation. Le **chapitre 2** étudie les mécanismes transcriptionnels responsables de cette modulation d'expression génique en réponse à l'ivermectine. Le **chapitre 3** décrit l'implication des récepteurs nucléaires dans la sensibilité et le développement de la résistance à l'ivermectine chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*. La seconde partie est composée de 2 chapitres. Le **chapitre 4** évalue la capacité de certains flavonoïdes à potentialiser l'efficacité de l'ivermectine chez *C. elegans* et le **chapitre 5** celui de l'ivermectine aglycone chez le nématode parasite *Teladorsagia circumcincta*.

A la suite de ces deux volets s'ensuit une **discussion générale** sur l'ensemble des résultats. Afin de garantir une thérapeutique durable des LMs, des **perspectives**, sur le moyen et long terme, sont alors proposées.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES LACTONES MACROCYCLIQUES ANTHELMINTIQUES

Historiquement, les premières molécules utilisées pour le contrôle des nématodes gastro-intestinaux étaient les benzimidazoles. Rapidement, des résistances à ces molécules sont apparues mettant en péril leur contrôle. De nouvelles molécules avec un nouveau mode d'action ont été créées. Les lactones macrocycliques anthelminthiques (LMs) ont alors été commercialisées. Les LMs forment une famille de médicaments largement utilisée pour le contrôle des parasites. Ces molécules ont d'abord été développées en thérapeutique vétérinaire et leur utilisation a été plus tard élargie à la thérapeutique humaine (McKellar and Benchaoui, 1996). Leur succès repose sur leur activité à large spectre : elles sont efficaces à la fois contre les endo- et les ectoparasites, d'où leur nom endectocides, mais aussi pour leur facilité d'utilisation et leur innocuité. L'ivermectine a été la première LM commercialisée et elle est encore à l'heure actuelle la plus utilisée. En médecine humaine, l'ivermectine est utilisée dans les traitements de masse afin de lutter contre l'onchocercose, maladie tropicale due à l'infection par le nématode *Onchocerca volvulus*. Le traitement par l'ivermectine de plusieurs dizaines de milliers de personnes, sous le contrôle de l'Organisation Mondiale de la Santé, a permis de diminuer considérablement le développement de cette maladie (Geary, 2005). Dans nos pays, elle est utilisée plus particulièrement dans le traitement des strongyloses et des gales. En médecine vétérinaire, les LMs sont utilisées pour les animaux de compagnie et surtout en élevage dans la prévention et le traitement des troupeaux contre les infections par les nématodes gastro-intestinaux. L'ivermectine est aussi utilisée dans la lutte contre les insectes et a été utilisée à faible dose avec succès dans le plan de contrôle du varron, mouche dont le stade larvaire parasite les mammifères et affecte les cuirs (Hassan et al., 2010).

Les LMs sont des produits naturels, ou des dérivés, issus initialement de la fermentation d'Actinomycètes du genre *Streptomyces*. La classe thérapeutique des LMs est divisée en deux sous-classes principales : les avermectines et les milbémycines (**Figure 1**).

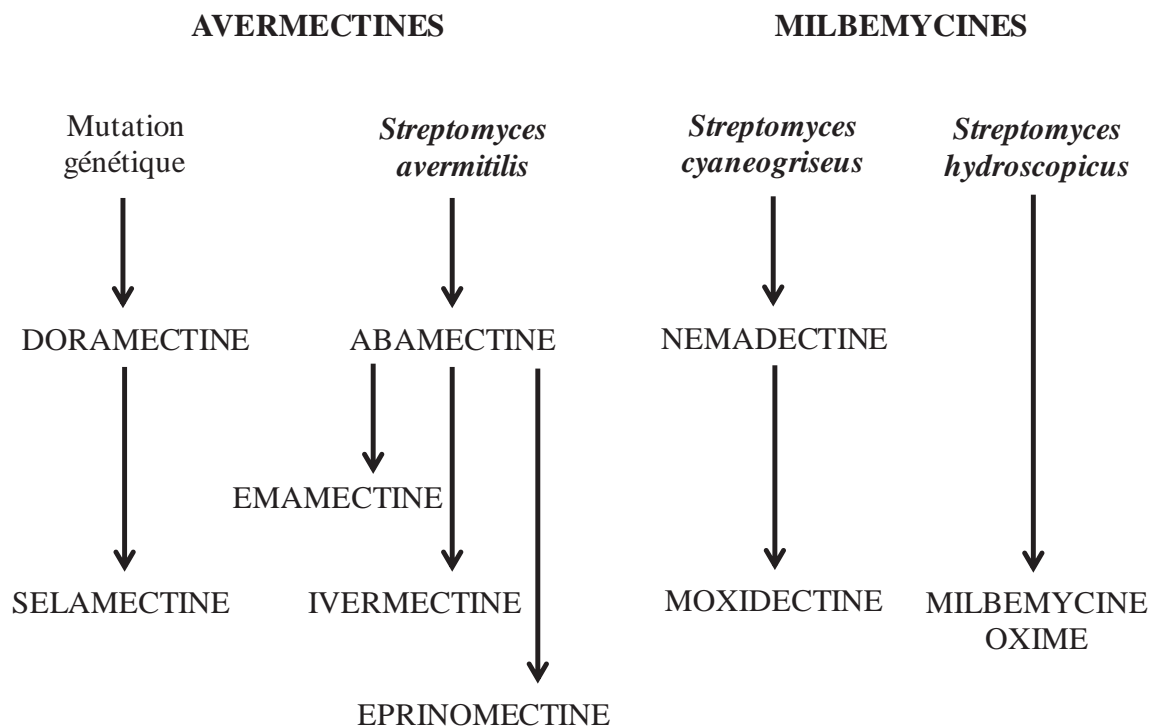


Figure 1 : Filiation schématique des lactones macrocycliques anthelmintiques (LMs) : des bactéries du sol aux produits thérapeutiques

Les LMs sont composées d'un macrocycle, d'une fonction furane et d'une fonction spirotécal. Ce qui les différencie est la nature des substituants des carbones en position 25 et parfois en position 5. La différence structurale majeure entre ces deux familles réside, entre autres, dans l'absence du disaccharide en position 13 chez les milbémycines. Les milbémycines diffèrent également des avermectines aglycones car elles sont protonées en position 13 alors que les avermectines aglycones sont hydroxylées. La structure générale des LMs est présentée sur la **Figure 2**.

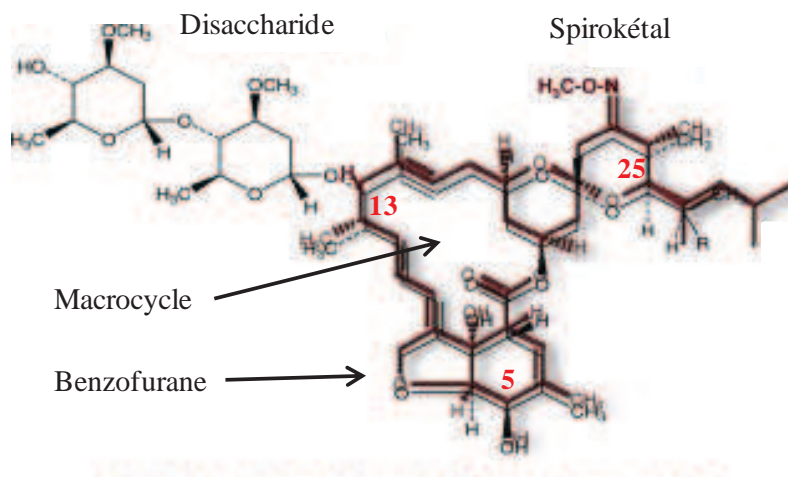


Figure 2: Structure générale des lactones macrocycliques anthelminthiques
 La structure des mylbémycines (rouge foncé) est superposée à celle des avermectines (noir)
 Adapté de Prichard et al., 2012

A l'origine, le champignon *Streptomyces avermitilis* a permis, à l'issue de sa fermentation d'isoler 8 avermectines. Seules les avermectines B1a et B1b sont obtenues en quantités exploitables. Les structures des avermectines B1a et B1b sont présentées **Figure 3**.

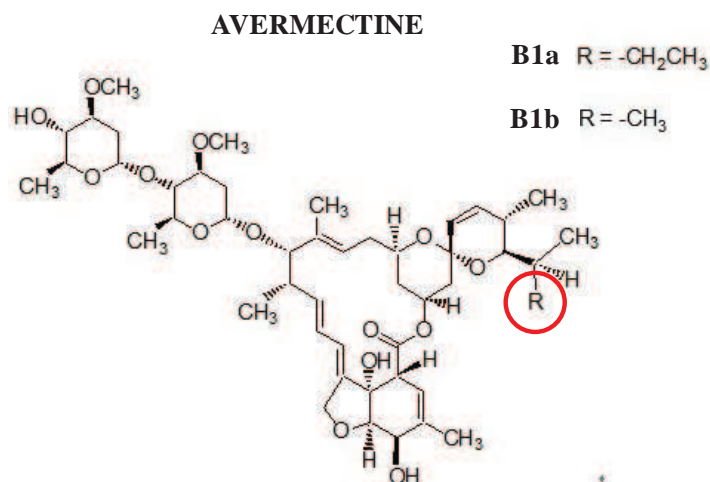


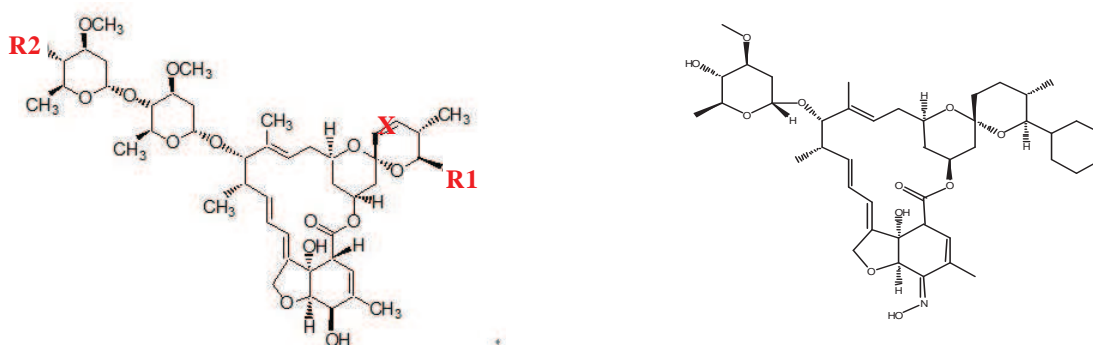
Figure 3 : Structure générale des avermectines B1a et B1b

L'avermectine B1a possède une fonction méthoxyle en C-5 ainsi qu'une double liaison entre les carbones 22 et 23. Elle est aussi dotée d'un groupement butyle en C-25. L'avermectine B1b est composée quant à elle, d'une fonction hydroxyle en C-5 et possède en C-25 un groupement isopropyl.

1.1. Les avermectines

La famille des avermectines regroupe 6 molécules : l'abamectine, l'émamectine, l'ivermectine, la doramectine, l'éprinomectine et la selamectine. Le mélange d'ivermectine B1a (> 90 %) et d'ivermectine B1b (< 10 %) constitue l'abamectine. L'ivermectine, qui est la molécule phare de cette famille est une molécule semi-synthétique. La doramectine, l'éprinomectine et la selamectine sont trois molécules biosynthétiques.

Les structures des avermectines sont présentées **Figure 4**.



Ivermectine B1A: $X = \text{CH}_2\text{CH}_2$ $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{OH}$

Doramectine: $X = \text{CH} = \text{CH}$ $R_1 = \text{Cyclohexyl}$ $R_2 = \text{OH}$

Eprinomectine: $X = \text{CH} = \text{CH}$ $R_1 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{NHOOCH}_3$

Selamectine:

Figure 4 : Structure chimique des avermectines

L'ivermectine est un hybride, obtenu par héli-synthèse chimique, de l'abamectine. Elle est composée d'un mélange de 22,23-dihydroivermectine B1a (> 90 %) et de 22,23-dihydroivermectine B1b (< 10 %). Contrairement à la structure de l'abamectine, elle possède en C-26 un seul groupement méthylène. L'éprinomectine est une amino-ivermectine dérivée de l'ivermectine B1. Ses propriétés chimiques font qu'elle est largement utilisée chez les animaux laitiers en raison des très faibles résidus retrouvés dans le lait.

La doramectine a été obtenue par l'ajout d'un cyclohexyl sur le C-25 de l'ivermectine B1.

La selamectine dérive de la doramectine par un groupement hydroxyimine en C-5. Son autre particularité est son monosaccharide en C-13.

1.2. Les milbémycines (Prichard et al., 2012)

On retrouve 3 molécules dans cette famille. La nemadectine et la moxidectine qui sont issues de la fermentation du champignon *Streptomyces cyanogriseus* et la milbémycine oxime issue de celle du champignon *Streptomyces hydroscopicus*. Leurs noms chimiques ainsi que les structures des milbémycines sont présentés **Figure 5**.

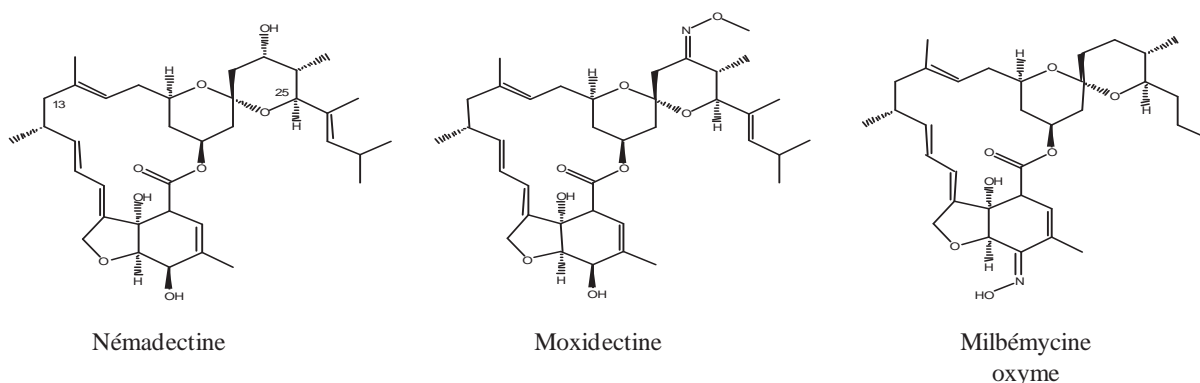


Figure 5 : Structure chimique des milbémycines

La milbémycine a été la première lactone macrocyclique découverte en 1972. Un dérivé de cette molécule a été par la suite créé : la milbémycine oxyme.

En 1983, une autre milbémycine a été découverte : la nemadectine. A partir de cette molécule, une milbémycine biosynthétique a été créée par l'ajout d'un groupement méthoxyme en C-23 : la moxidectine. Elle est aussi composée d'une chaîne latérale oléfinique en C-25. Cette dernière est la molécule phare de cette famille. L'absence du disaccharide au sein de la famille des milbémycines les rend hautement lipophiles.

1.3. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action sur les nématodes est commun à l'ivermectine et à la moxidectine. Il est basé sur leur interaction avec les canaux chlorures glutamate-dépendants. Elles agissent par effet GABA-mimétique. De par leur effet agoniste, elles maintiennent ces canaux en position ouverte entraînant un afflux massif d'ions chlorures au sein des cellules nerveuses de parasites. Ceci entraîne une hyperpolarisation des membranes ayant pour conséquence une inhibition de l'influx nerveux au niveau des jonctions neuromusculaires. Le pharynx (Arena et al., 1995), le corps musculaire (Wolstenholme and Rogers, 2005) ainsi que les muscles utérins (McKenna, 1997; Scott et al., 1991) du parasite sont alors paralysés. Il ne peut donc plus se nourrir, se mouvoir et se reproduire. Par conséquent, le parasite meurt. Aucune des LMs n'est efficace sur les cestodes et les trématodes car ils sont dénués de récepteur chlorure

glutamate-dépendant (Shoop et al., 1995). Chez les vertébrés, elles peuvent activer et moduler l'activité d'une grande variété de récepteurs Cys-loop incluant les récepteurs GABA (Accardi et al., 2012). Les récepteurs GABA ne sont retrouvés qu'au niveau du système nerveux central, expliquant la toxicité potentielle de ces molécules lorsqu'elles passent la barrière hémato-encéphalique (Schinkel et al., 1994; Schinkel et al., 1996).

1.4. Pharmacocinétique

Pour les médicaments à action systémique comme les LMs, l'efficacité thérapeutique est directement reliée à la concentration du principe actif dans les tissus cibles, elle-même corrélée à la concentration plasmatique chez l'animal hôte. La pharmacocinétique permet d'étudier l'évolution de la concentration du médicament en fonction du temps après son administration dans l'organisme. Elle est composée de quatre phases principales: l'absorption, la distribution, la biotransformation ou métabolisme et l'élimination (ADME). Ces paramètres diffèrent en fonction de la molécule, de la voie d'administration et de la forme sous laquelle le composé est administré. Ainsi, en mesurant les concentrations dans le plasma et en calculant les différents paramètres pharmacocinétiques plasmatiques, on peut déduire le devenir du médicament chez l'hôte et prédire son efficacité thérapeutique. Compte tenu de leurs caractéristiques physicochimiques qui leur confèrent un statut fortement lipophile, le comportement des LMs dans l'organisme se caractérise par une longue rémanence, un grand volume de distribution ainsi qu'une longue persistance dans le corps à des concentrations biologiquement actives. Elles ont une forte affinité pour les tissus riches en graisses tels que le foie et les graisses elles-mêmes.

Il existe de nombreuses données publiées qui mettent en avant les différences de pharmacocinétiques des LMs. A titre d'exemple, les données pharmacocinétiques comparatives des 2 LMs phares de chaque famille, l'ivermectine et la moxidectine, sont présentées dans le **Tableau 1**. Ces valeurs ont été obtenues chez différentes espèces par différents modes d'administrations.

Tableau 1 : Paramètres pharmacocinétiques de l'ivermectine et de la moxidectine dans le plasma de différentes espèces animales en fonction des voies d'administrations

Espèce	IVERMECTINE						MOXIDECTINE				
	VA Dose	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)	AUC (ng/h/ml)	T1/2 (h)	MRT (h)	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)	AUC (ng/h/ml)	T1/2 (h)	MRT (h)
Bovin	SC 200	42.8	96	11016	412.8	176.4	39.4	7.7	5208	348	34
	T 500	12.2	81.6	2916	127.2	201.6	2.3	32.2	520.3	214.8	306.7
Mouton	SC 200	25.8	29.8	1969.4	40.1	-	65.1	3.6	4746.5	191.0	
	O 200	11.3	31.9	1072.8	87.1	82.8	27.1	5.3	2373	504.9	301.2
Porc	SC 300	7.4	71.9	2680.8	-	235.2	91.3	1.0	2712.0	-	126
Chèvre	SC 200	10.2	55.9	1761.1	91.4	152.4	24.3	8.6	3280	-	297.6
	O 200	10.3	13.7	292.3	16.1	27.1	15.5	9.1	880.8	288.0	247.2

VA : Voie d'administration, SC : sous-cutanée, O : orale, T : topique, Cmax : Concentration maximale, Tmax : Temps pour atteindre la concentration maximale, AUC : aire sous la courbe, T_{1/2} : temps de demi-vie, MRT : Temps moyen de résidence. D'après (McKellar and Gokbulut, 2012)

Le t_{max} de la moxidectine est plus faible que celui de l'ivermectine quelle que soit la voie d'administration. Le temps de résidence moyen (MRT) est plus élevé pour la moxidectine que pour l'ivermectine. La rapide absorption de la moxidectine ainsi que sa demi-vie environ 4 à 5 fois supérieure à celle de l'ivermectine peut s'expliquer par sa forte lipophilie. En effet, la moxidectine se répartit très vite dans les graisses et est redistribuée dans le plasma durant une longue période. On observe une AUC au minimum 2 fois plus faible pour les deux molécules lorsqu'elles sont administrées par voie orale suggérant une meilleure absorption par voie sous cutanée. La voie d'administration est un paramètre qui fait varier les données pharmacocinétiques. Beaucoup d'études mettent en évidence une meilleure biodisponibilité des LMs lorsqu'elles sont administrées par voies sous-cutanées.

La voie majoritaire d'élimination des LMs et de leurs métabolites se fait principalement par la sécrétion intestinale (Laffont et al., 2002) médiée par un transporteur ABC d'efflux, la P-glycoprotéine (P-gp), qui sera décrite en détail dans la suite de ce manuscrit.

1.5. Devenir des LMs dans l'organisme hôte

Une fois dans l'organisme, le devenir des lactones macrocycliques va dépendre de deux acteurs principaux du système de détoxification: majoritairement les transporteurs ABC d'efflux et à un moindre niveau les cytochromes.

1.5.1. Les transporteurs ABC

1.5.1.1. Généralités

Les transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette ») appartiennent à une grande famille de protéines, présentes chez tous les règnes vivants, et qui comprend un certain nombre de transporteurs membranaires actifs. Le rôle est le transport unidirectionnel, dans le sens efflux ou influx, de part et d'autre de la membrane plasmique ou de membranes internes, de diverses substances exogènes ou endogènes telles que des ions, des peptides, des glucides, des hormones ou des lipides, en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

Chez les mammifères, sur les 48 protéines ABC séquencées, quelques transporteurs ABC ont la capacité de transporter activement une grande variété de xénobiotiques. Ces transporteurs ABC d'efflux sont retrouvés au niveau des tissus impliqués dans l'excrétion, tels que le foie et le rein, mais aussi au niveau des différentes barrières de l'organisme, comme l'intestin et la barrière hémato-encéphalique. Leur activité permet la protection de l'organisme en diminuant la concentration des composés potentiellement toxiques. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux quelques transporteurs ABC d'efflux qui sont responsables du phénotype MDR (« Multi-Drug Resistance »), incluant la protéine ABCB1. Ils ont été appelés les protéines de la résistance multidroge du fait de leur rôle important dans la résistance de tumeurs aux traitements chimiques. En effet, ces transporteurs agissent en limitant l'accumulation de composés cytotoxiques dans les cellules tumorales (Sharom, 2008).

1.5.1.2. Structures

Par définition, une protéine ABC contient dans sa séquence un site nucléotidique typique NBD (« Nucleotide-Binding Domain ») caractérisé par la présence des motifs consensus « Walker A », « Walker B » et la « signature C ». Dans la majorité des cas, elles sont membranaires, grâce à un domaine transmembranaire (« TMD ») qui lui est relié, et l'unité fonctionnelle est toujours constituée de l'association, covalente ou non, de 2 NBD et 2 TMD. Elles sont classifiées en 7 sous-familles (notées de A à G).

Les structures secondaires des transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2 sont présentées **Figure 6**.

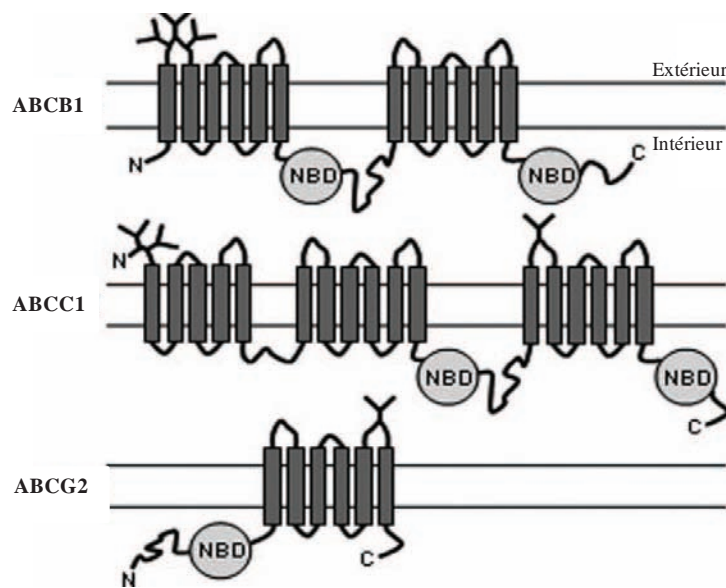


Figure 6 : Structure secondaire des transporteurs ABCB1, ABCC1 et ABCG2
Adapté de (Eckford and Sharom, 2009)

- ABCB1 est un transporteur composé de 2 TMDs formés chacun de 6 segments transmembranaires et de 2 NBD cytoplasmiques. Les extrémités N- et C- terminales sont cytoplasmiques. La première boucle extracellulaire porte 3 sites de glycosylation, mais cette glycosylation n'a pas de rôle fonctionnel sur le transport.
- ABCC1 possède un TMD supplémentaire (TM0) formé de 5 segments transmembranaires en N-terminal ; ce n'est pas le cas de ABCC4 et C5. L'extrémité N-terminale est en position extracellulaire et comporte 2 glycosylations. L'extrémité C-terminale se situe dans le cytoplasme. Une glycosylation supplémentaire est retrouvée sur la première boucle extracellulaire du TM2. Les ABCC2-9 (MRP3 à 9) transportent de nombreuses molécules d'intérêt pharmacologiques, mais n'ont pas été décrites comme responsables du phénotype MDR de cellules tumorales.
- ABCG2 est un « héli-transporteur » composé de 6 segments transmembranaires. Le NBD est cytoplasmique mais, contrairement à ABCB1 et aux ABCCs, se situe en N-terminal du TMD. Une glycosylation sur la dernière boucle extracellulaire est retrouvée.

1.5.1.3. La phylogénie des transporteurs ABC humains

Lorsque l'on regarde l'arbre phylogénétique des séquences entières codant pour les transporteurs ABC humains (**Figure 7**), on retrouve leur répartition en sous-familles bien

séparées : de A à F. Les longueurs respectives des branches de cet arbre montrent que durant l'évolution, d'importantes variations de ces molécules sont survenues, probablement en lien avec leurs différences de localisation et de fonctionnalité.

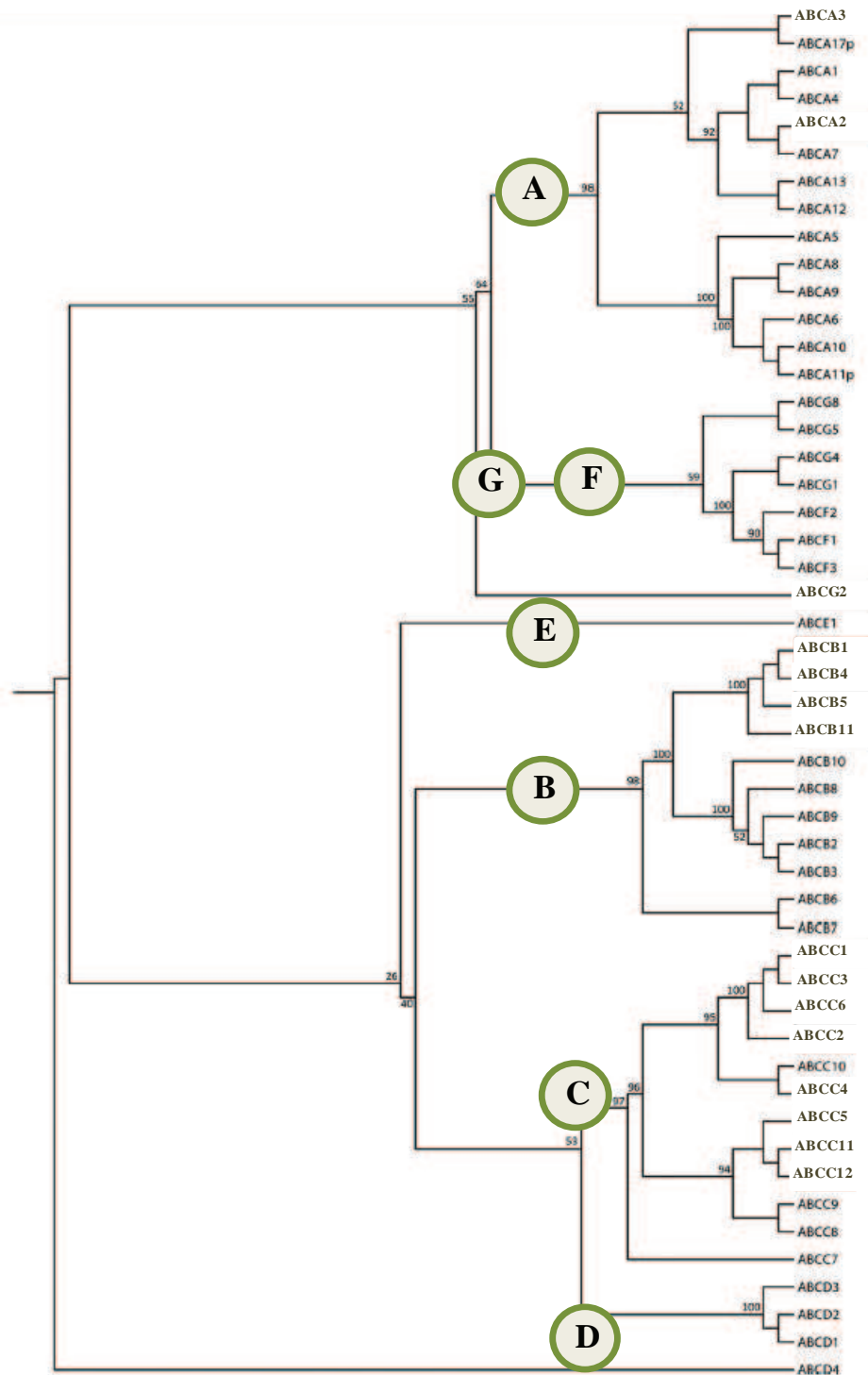


Figure 7 : Arbre phylogénétique des transporteurs ABC humains.

Les valeurs représentent les « bootstraps » en pourcentage. Elles évaluent la fiabilité des branches.

Adapté de (Fisher et al., 2012).

1.5.1.4. Transporteurs ABC et résistance multidrogue et/ou détoxification de l'organisme

Le **Tableau 2** récapitule les principaux transporteurs ABC décrits pour être impliqués dans la résistance multidrogue des cellules tumorales et/ou la détoxification de l'organisme.

Tableau 2 : Principaux transporteurs ABC impliqués dans le phénotype MDR et/ou la détoxification de l'organisme : Dénominations et localisations

Nom des protéines	Distribution tissulaire	Localisation polarisée
ABCB1/ P-glycoprotéine (GP170)	Barrière hémato-encéphalique, Foie, Intestin, Rein, Placenta, Cellules souches	Apicale
ABCC1/ MRP1	Poumon, Testicule, Rein, Muscles cardiaque et squelettique, Placenta, Cellules mononucléaires du sang périphérique	Basolatérale
ABCC2/MRP2	Barrière hémato-encéphalique, Foie, Intestin, Rein, Placenta, Poumon	Apicale
ABCC3/MRP3	Intestin, Pancréas, Placenta, Foie, Prostate, Rein	Basolatérale
ABCC4/MRP4	Ovaire, Testicule, Rein, Poumon, Prostate	Apicale, Basolatérale
ABCC5/MRP5	Foie, Testicule, Muscles cardiaque et squelettique, Cerveau	Apicale, Basolatérale
ABCG2/BCRP/ MXR (ABCP)	Barrière hémato-encéphalique, Placenta, Foie, Intestin, Sein, Cellules souches	Apicale

Adapté de (Sharom, 2008; Szakacs et al., 2008)

Les transporteurs ABC d'efflux sont majoritairement localisés au niveau des pôles apicaux des cellules polarisées, en accord avec leur rôle dans la limitation de l'entrée des molécules substrats et dans l'augmentation de leur élimination. Combinés, ces rôles contribuent à la défense de l'organisme envers les xénobiotiques, potentiellement toxiques, auquel il peut être exposé (alimentation, inhalation).

1.5.1.5. Transporteurs ABC et LMs

L'ivermectine a été la première LM décrite comme étant substrat de la P-gp (ABCB1). Les animaux déficients pour le gène codant ABCB1 sont doués d'une hypersensibilité marquée à l'ivermectine. En effet, cela a été montré chez les chiens de la race Colley ayant une mutation naturelle sur le gène *Abcb1*, (Mealey et al., 2001; Roulet et al., 2003), chez une sous-population de souris CF-1 (Kwei et al., 1999) et chez les souris knock-out pour les gènes

Abcb1a et *Abcb1b* (Schinkel et al., 1994). Ce phénotype est lié à une absence d'efflux du composé via la P-gp et donc à son accumulation dans les cellules. La molécule non effluée peut se fixer sur les canaux ioniques récepteurs du GABA présents dans le cerveau des animaux, et entraîne alors des effets neurotoxiques. Comme nous l'avons vu précédemment, la plupart des LMs sont éliminées majoritairement par un processus de sécrétion intestinale médiée par la P-gp (Ballent et al., 2007; Kiki-Mvouaka et al., 2010; Laffont et al., 2002). Cette dernière contribue donc à diminuer la durée de vie de la molécule au sein de l'organisme et par conséquent peut limiter l'efficacité du médicament.

En relation avec leur caractère de substrats, donc de ligands, les LMs sont aussi des inhibiteurs de la fonction de transport des transporteurs ABC d'efflux, et notamment de la P-gp. Ces capacités d'inhibition des LMs envers la P-gp ont été étudiées, et montrent qu'elles sont différentes suivant les molécules. A titre d'exemple, il a été montré que la moxidectine est un inhibiteur de faible affinité de la P-glycoprotéine, contrairement à l'ivermectine qui en est un de forte affinité (Lespine et al., 2007).

Chez des souris déficientes en *Abcb1a* et *Abcb1b*, la cinétique plasmatique des LMs est fortement affectée par l'absence d'ABCB1, et ce de façon différente suivant la molécule considérée. L'absence d'ABCB1 n'influence pas la cinétique plasmatique de la moxidectine. L'excrétion de cette molécule est donc indépendante d'ABCB1.

L'ivermectine est également substrat d'autres transporteurs ABC, tels que ABCC1, ABCC2 et ABCC3, et est capable d'inhiber la fonction de transport de ABCG2 (Lespine et al., 2006).

L'utilisation d'inhibiteurs de la fonction de transport d'ABCB1 a permis de mettre en évidence son rôle dans la pharmacocinétique des LMs chez différentes espèces. Ainsi, chez le rat et le mouton, la co-administration du vérapamil augmente leur exposition à l'ivermectine (Alvinerie et al., 1999; Molento et al., 2004). Le kétoconazole, appartenant à la famille des dérivés dioxalanes triazoles, modifie la pharmacocinétique de l'ivermectine en induisant une augmentation de sa biodisponibilité plasmatique chez le mouton et le chien (Alvinerie et al., 2008; Hugnet et al., 2007). Le lopéramide, de la famille des opioïdes, augmente la concentration plasmatique de l'ivermectine et de la moxidectine chez les bovins (Lifschitz et al., 2002). Ces études montrent que l'association d'inhibiteurs de la fonction de transport d'ABCB1 avec les LMs permet d'augmenter leur biodisponibilité dans l'organisme, et constitue une stratégie attractive pour améliorer l'efficacité de ces médicaments (Lespine et al., 2008).

1.5.2. Les cytochromes

Des métabolites des LMs sont retrouvés au sein des organismes traités. Chez les bovins et les ovins, le métabolite principal de l'ivermectine est le 24-hydroxy-ivermectine, alors que chez le porc c'est le 3''-O-déméthyl-ivermectine. La métabolisation de l'ivermectine au sein de différentes espèces ne fait pas intervenir les mêmes cytochromes. Chez le rat, le cytochrome CYP3A est responsable de la présence du métabolite 3''-O-déméthyl-ivermectine et Cyp1A1 est responsable de celle du 26-hydroxy-ivermectine (Zeng et al., 1998; Zeng et al., 1996; Zeng et al., 1997). En ce qui concerne la moxidectine, chez les bovins, le métabolite principal est le C-29-hydroxyméthyl moxidectine, alors que chez le mouton, le métabolite principal est le C-14-hydroxyméthyl moxidectine. Une des caractéristiques notable de ces molécules est leur forte élimination sous forme de principe parental. En effet, 60 à 80 % des endectocides sont retrouvés sous forme inchangée (Fisher and Mrozik, 1992; Gonzalez-Canga et al., 2009; McKellar and Benchaoui, 1996). La métabolisation de ces médicaments joue un rôle mineur dans la différence de pharmacocinétiques observées pour ces molécules.

2. LA RESISTANCE AUX LMS CHEZ LE NEMATODE : ROLE DES TRANSPORTEURS ABC

La résistance aux LM est un problème majeur de santé vétérinaire répandu dans le monde entier. Il est donc urgent d'étudier les résistances à ces molécules afin d'éviter une impasse thérapeutique qui pourrait avoir des conséquences désastreuses en médecine vétérinaire. La solution viendra d'une connaissance précise des mécanismes de résistance. Les mécanismes possibles de résistance aux LM ont été étudiés chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* mais aussi chez de nombreuses souches parasites de terrain.

2.1. Définition de la résistance

En 1976, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) énonce la définition de la chimiorésistance : « Une population chimiorésistante est une population ayant génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d'antiparasitaires habituellement létales pour des individus de cette espèce » (OMS, 1976). Elle était initialement énoncée pour les arthropodes vecteurs, mais s'étend maintenant à la totalité des parasites.

2.2. Prévalence de la résistance aux LM dans le monde

Des cas de résistances aux LM sont maintenant décrits dans de nombreux pays. La résistance à l'ivermectine a été rapportée pour la première fois, en 1988 en Afrique du Sud, chez le parasite *H. contortus* (van Wyk and Malan, 1988).

La résistance aux LM semble être plus prévalente au sein de l'hémisphère Sud. En Nouvelle Zélande, la presque totalité des fermes étudiées présentent des parasites résistants aux LM (Kaplan et al., 2004).

Les premiers cas de résistance aux LM aux Etats Unis ont été décrits il y a 10 ans environ (Gasbarre et al., 2009). Dans cette étude, la résistance a été mise en évidence chez différents parasites : *C. punctata*, *H. placei*, ainsi que *H. contortus*. Une autre étude plus récente démontre la résistance aux LM dans la famille *Cooperia* (Gasbarre, 2014).

En Europe, la résistance aux LM reste la plus faible comparée au reste du monde. Des cas de résistance aux LM ont été rapportés au Royaume Uni (McArthur et al., 2011; Sargison et al., 2007; Sargison et al., 2010), en Belgique (El-Abdellati et al., 2010), en Grèce (Geurden et al., 2014) et en Suisse (Artho et al., 2007). En France, seul des cas de résistance à d'autres anthelminthiques tels que les benzimidazoles ont été mis en évidence (Chartier et al., 2001; Geurden et al., 2014). Il est important de noter que peu de travaux ont étudié spécifiquement la résistance aux LM en France. A ce jour, aucun cas de résistance aux LM n'a encore été mis en évidence en France.

2.3. Mécanismes de la Résistance aux LMs

Il existe deux sortes de mécanismes de résistance aux LMs: les mécanismes dits spécifiques et les mécanismes non spécifiques.

2.3.1. Mécanismes de résistance spécifique

Les mécanismes de résistances spécifiques consistent en un défaut de la cible à l'anthelminthique chez le parasite. Elle est décrite pour d'autres classes d'anthelminthiques : le levamisole, le monepente et les benzimidazoles. Concernant ces derniers, une mutation sur le codon 200 de la β tubuline, entraîne un changement d'acide aminé, qui confère la résistance à cette famille de molécule (Kwa et al., 1994; Von Samson-Himmelstjerna et al., 2007).

Les cibles spécifiques des LMs anthelminthiques sont les canaux chlorure-glutamate dépendants. Il est bien établi qu'une mutation d'un ou plusieurs de ces récepteurs conduit à la résistance à l'ivermectine chez *C.elegans* . Cependant, des mutations de ces gènes n'ont été décrites que très rarement chez des parasites de terrain. Un polymorphisme de L256F sur le gène *avr-14* a été associé à la résistance à l'ivermectine, chez un isolat de *C. oncophora* au Royaume-Uni (Njue and Prichard, 2004). Ce polymorphisme n'a pas été retrouvé à la fois chez des isolats Belges de *C. oncophora* et de *O. osteragi* résistants à l' ivermectine (El-Abdellati et al., 2011). Chez *C. oncophora*, un polymorphisme sur le gène *avr-14* ayant pour conséquence une sensibilité accrue à l' ivermectine a été décrit. Une autre étude a comparé les séquences et les expressions du gène *avr-14B*, qui code pour une sous unité protéique des canaux chlorures glutamates-dépendants, chez des isolats de *Cooperia oncophora* sensibles et résistantes à l'ivermectine. Aucun polymorphisme spécifique de l'isolat résistant n'a été mis en évidence. C'est le nombre d'isoformes et le nombre de transcrits de ce gène qui sont significativement diminués chez l'isolat résistant à l'ivermectine (El-Abdellati et al., 2011). Un polymorphisme sur plusieurs sous unités du gène *avr* chez *H. contortus* a aussi été décrit. Cette étude conclue que la résistance à l'ivermectine doit être certainement polygénique (McCavera et al., 2007). Chez *T. circumcincta*, la résistance à l' ivermectine n'est pas associée à des SNPs sur la sous-unité *avr-14B* (Martinez-Valladares et al., 2012).

A ce jour, il n'y a pas de mutation identifiée au niveau de la cible, qui pourrait expliquer à elle seule, les phénotypes de résistance aux LMs observés dans différents isolats des différents espèces de parasites étudiés (Kotze et al., 2014).

2.3.2. Mécanismes de résistance non spécifiques

Les mécanismes de résistances non spécifiques concernent des acteurs du processus de « détoxification ». Plus précisément, la cible thérapeutique est identique au parasite sensible mais des modifications génétiques ailleurs dans son génome vont lui permettre de devenir résistant au médicament.

Ces mécanismes de détoxification non spécifiques vont permettre soit d'excréter l'agent thérapeutique actif sous sa forme initiale, soit de le dégrader via des enzymes. Une activation de ces voies métaboliques va conduire à une efficacité moindre du médicament.

Il existe 3 phases dans le système de détoxification :

- La phase I qui consiste à la dégradation du toxique via des réactions d'oxydation, de réduction, et/ ou d'hydrolyse et qui fait intervenir des cytochromes P450 oxygénases, des réductases ou encore des hydrolases.
- La phase II qui a pour but la conjugaison des produits de dégradation par des glutathion-S-transférases (GST) afin de favoriser leur élimination.
- La phase III qui consiste en l'élimination des composés parentaux ou des métabolites, soit par séquestration, soit par excrétion via les transporteurs ABC d'efflux.

Chez le nématode *C. elegans*, on compte 83 cytochromes. Concernant la première phase, peu d'études mettent en évidence l'implication des cytochromes dans la résistance aux LMs. Une seule étude chez *C. elegans* a permis de mettre en évidence une surexpression d'un cytochrome, le CYP37B1 chez une souche résistante à l'ivermectine (Laing et al., 2012). Néanmoins, les auteurs tempèrent ce résultat quant à l'implication de ce cytochrome dans le métabolisme de l'ivermectine car il est décrit pour intervenir dans le métabolisme des acides gras endogènes.

Récemment, une équipe a prouvé, à l'aide du test *in vitro* de *Larval Inhibition Migration Assay*, que l'utilisation d'un inhibiteur des cytochromes, le piperonyl butoxide, entraînait l'augmentation de la sensibilité à l'ivermectine chez *Cooperia oncophora* et *Ostertagia ostertagi* (AlGusbi et al., 2014). Ils concluent à l'implication des cytochromes dans la résistance à l'ivermectine.

Concernant les acteurs de la phase II, aucune étude n'a mis en évidence une implication directe de la GST lors de résistances aux LMs. Seule une étude ancienne démontre une induction de la GST sur une souche de *H. contortus* résistante à un autre anthelminthique, le thiabendazole (Kerboeuf and Aycardi, 1999).

Le mécanisme le plus étudié à ce jour dans la résistance aux LMs est celui impliquant les transporteurs ABC d'efflux.

2.3.2.1. Les transporteurs ABC de nématodes

De nombreux homologues des transporteurs ABC ont été décrits dans la littérature, aussi bien chez le nématode modèle (non parasitique et non pathogène) *C. elegans* que chez différents nématodes parasites de terrain.

Le génome de *C. elegans* est totalement séquencé et annoté. Il est donc le mieux décrit, et est celui qui possède le plus de transporteurs ABC. En effet, son génome comporte les séquences de 61 protéines ABC classées en 8 sous familles, notées de A à H. Un peu plus de la moitié de ces séquences codent pour des homologues des transporteurs ABC multidrogues, comptés en regroupant (par analogie avec les transporteurs de mammifères) les transporteurs entiers de la sous-famille B, les membres de la sous-famille C (tous entiers) et ceux de la sous-famille G (tous hémis).

A ce jour, *C. elegans* paraît être le nématode qui comporte le plus de transporteurs ABC (**Tableau 3**). Etant un nématode libre du sol, il est envisageable qu'existent des mécanismes lui permettant de faire face aux diverses agressions extérieures. Les parasites de terrain sont, quant à eux, relativement protégés par leur hôte qui les abrite, avec en particulier une moins grande diversité des types d'agressions possibles. Par conséquent, on peut spéculer que le nombre de transporteurs ABC multidrogues est moindre, même si cela ne tient pas compte des différentes fonctions physiologiques remplies par les autres transporteurs ABC ayant des substrats endogènes.

Tableau 3 : Inventaire des transporteurs ABC d’efflux chez le nématode modèle *C.elegans* et les principaux helminthes parasites ^a

Nématodes	Sous famille des transporteurs ABC d’efflux			
	B		C	
	HAF	ABCB	ABCC	Total
<i>C. elegans</i>	10	17	8	35
<i>O. volvulus</i>	3	4	1	8
<i>H. contortus</i>	4	10	6	20
<i>T. circumcincta</i>	1	10	–	11
<i>C. oncophora</i>	5	7	3	15

^a ce tableau est mis à jour et issu de la publication de (Ardelli, 2013). Les données sont compilées des publications suivantes : (Ardelli and Prichard, 2004; 2007; De Graef et al., 2013; Dicker et al., 2011; Huang and Prichard, 1999; Laing et al., 2013; Sangster et al., 1999; Sheps et al., 2004; Zhao et al., 2004)

2.3.2.1.1. La phylogénie des transporteurs ABC : Mammifères versus *C.elegans*

Comme vu précédemment, chez l’Homme, les transporteurs ABC sont classifiés en 7 sous-familles, annotées de A à G. Lorsque l’on regarde l’arbre phylogénétique construit à partir des transporteurs ABC de mammifères comparés aux 3 grands modèles biologiques que sont la drosophile *D. melanogaster* (Dm), le nématode *C. elegans* (Ce) et la levure *S. cerevisiae*, (Sc) il apparait qu’au cours de l’évolution, l’ancêtre commun à Ce, Dm et Hs possédait une « extension » des séquences codant pour des ABCB. Celle-ci a été perdue de façon indépendante chez Hs et Dm (**Figure 8**), expliquant le nombre important d’ABCB chez *C. elegans*. Il apparait aussi que des couples d’ABCB Hs/Ce sont proches, comme par exemple HsB6 et CeHaf5, ou encore HsB8 et CeHaf6. Dans ce cas précis, on peut parler d’orthologues. Toutefois, pour la plupart des autres transporteurs ABC, ce n’est pas le cas, et on observe des divergences notables des séquences entre Ce et Hs.

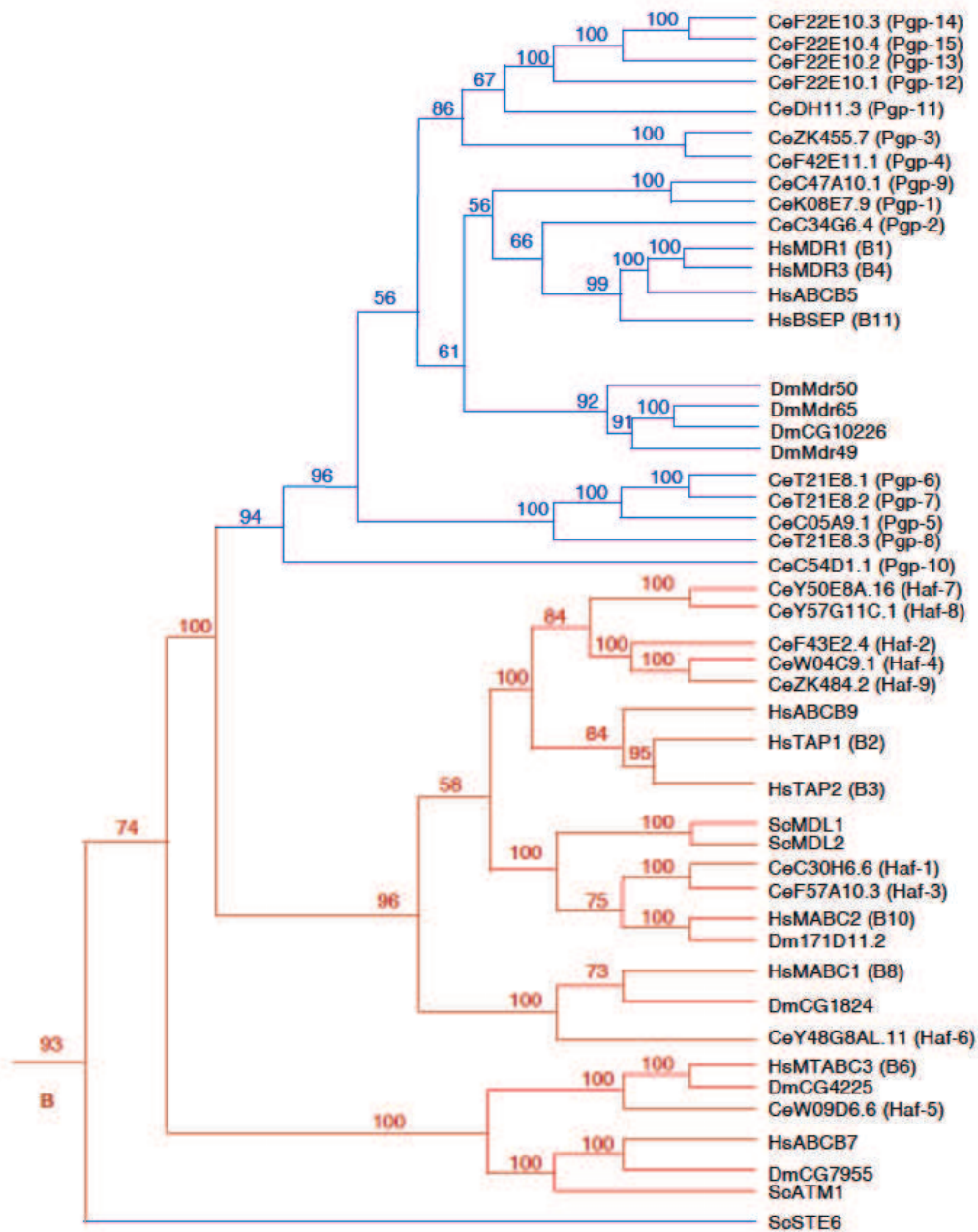


Figure 8 : Arbre phylogénétique des transporteurs ABCB dans 4 génomes eucaryotes : *Homo sapiens* (Hs), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (Dm) et *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Les valeurs représentent les « bootstraps » en pourcentage. Elles évaluent la fiabilité des branches. Daprès (Sheps et al., 2004)

2.3.2.1.2. La phylogénie des transporteurs ABC : *C. elegans* versus *H. contortus*

Lorsque l'on regarde l'arbre phylogénétique qui compare les structures des transporteurs ABC des deux nématodes *C. elegans* et *H. contortus*, on observe que leurs protéines ABC se classifient de manière très proche (**Figure 9**). La presque totalité des séquences chez *H. contortus* sont en couple d'orthologie avec celles de *C. elegans*. Cependant, il y a quelques contre-exemples, comme pour Hco-pgp13, qui peut être associée à Cel-pgp12, 13 ou 14, et inversement pour Cel-pgp5-6-7-8 qui ne semblent pas avoir d'équivalents chez Hco. Aussi, Hco-pgp16-17 n'ont pas d'homologues chez *C. elegans*.

Le modèle *C. elegans* est, par conséquent, un assez bon modèle pour l'étude des transporteurs ABC du parasite de terrain *H. contortus*.

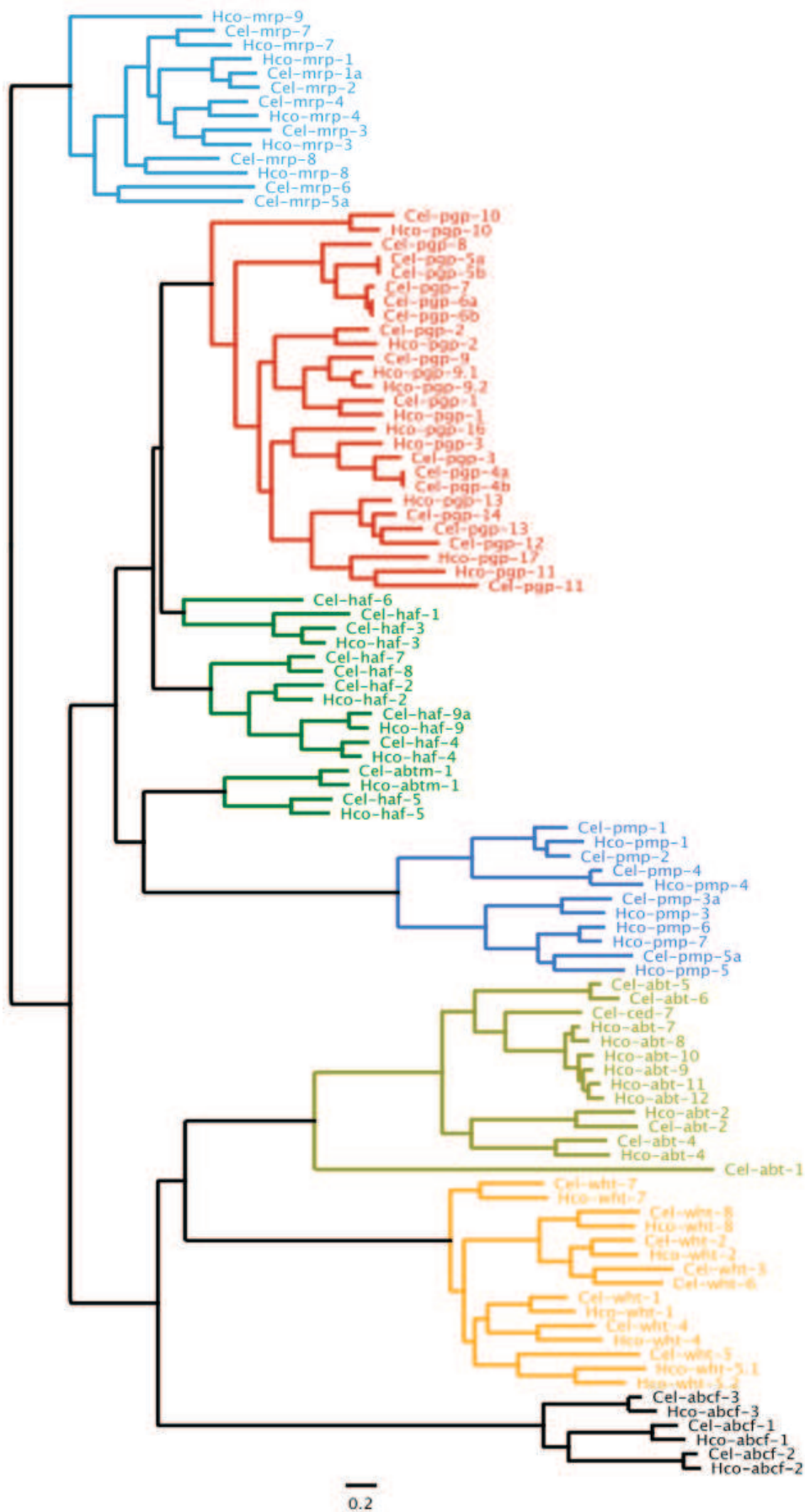


Figure 9 : Arbre phylogénétique des transporteurs ABC des génomes de *C. elegans* (Cel) et de *H. contortus* (Hco). D'après (Laing et al., 2013)

2.3.2.2. Selection d'allèles codant pour les transporteurs ABC d'efflux chez les principaux helminthes résistants aux LMs

La sélection d'allèles sur les gènes codant pour les transporteurs ABC lors de traitements à l'ivermectine a été démontrée chez différentes espèces de parasites et est présentée **Tableau 4**. Il est important de noter que la multiplicité des homologues de transporteurs ABC chez le nématode freine les recherches à ce sujet et rend difficile l'élucidation de Single Nucleotide Polymorphism (SNP) en tant que marqueurs de la résistance.

Tableau 4 : Inventaire des études proposant les transporteurs ABC d'efflux comme marqueurs moléculaires de la résistance aux LMs chez les principaux nématodes gastro-intestinaux.

Nématodes	LM	Evidences génétiques	Gènes	Références
<i>H. contortus</i>	IVM/ MOX	Augmentation fréquence de l'allèle A	ABCB	(Blackhall et al., 1998)
	AVM/ MYB	Polymorphisme	ABCB	(Sangster et al., 1999)
	IVM	Polymorphisme	ABCB1	(Le Jambre et al., 1999)
<i>O. volvulus</i>		SNPs/Polymorphisme	OvMDR1/O vABC1	(Ardelli and Prichard, 2004)
		Polymorphisme	ABCBs	(Eng and Prichard, 2005)
	IVM	Polymorphisme	ABCB	(Ardelli et al., 2005)
		Polymorphisme	OvPLP	(Ardelli et al., 2006)
		Polymorphisme	OvABC-3	(Ardelli and Prichard, 2007)
		SNPs	PLP	(Bourguinat et al., 2008)
<i>T. circumcincta</i>	IVM	Polymorphisme	Tci-Abcb-9	(Dicker et al., 2011)
<i>C. oncophora</i>	IVM	SNPs	Con-Abcb-2	(Demeler et al., 2013)
<i>D. immitis</i>	IVM	SNPs	P-gp	(Bourguinat et al., 2011; Geary et al., 2011)
<i>P. equorum</i>	IVM	SNPs	PeqAbcb11	(Janssen et al., 2013a)

Il a été montré pour la première fois chez *H. contortus* en 1998, que la résistance à l'ivermectine était en partie liée à un polymorphisme au niveau de la région promotrice

d'*Abcb2* entraînant une surexpression du transporteur. Chez ce parasite, des résultats similaires mettant en évidence des différences alléliques sur ce gène ont été décrits (Blackhall et al., 1998; Le Jambre et al., 1999; Sangster et al., 1999). Chez le parasite *O. volvulus*, des polymorphismes sur différents transporteurs ABC ont été identifiés en lien avec la résistance à l'ivermectine. Le plus intéressant à ce jour reste le changement d'un acide aminé sur la séquence génique de l'hémi-transporteur *OvPLP-1*. Ce dernier est proposé comme marqueur de la résistance à l'ivermectine chez *O. volvulus* (Bourguinat et al., 2008). Un polymorphisme a aussi été décrit sur le gène codant ABCB9 d'un isolat de *T. circumcincta* résistant. En effet, 4 SNPs sur une région de 208 pb du gène sont présentes sur la souche résistante (Dicker et al., 2011). Récemment, de nombreux SNPs sur le gène *ConAbcb-2* de *C. oncophora* ont été décrits mais aucun ne permet de discriminer les individus sensibles et résistants à l'ivermectine (Demeler et al., 2013). Une étude récente sur *Parascaris equorum* met en évidence 3 SNPs présentes sur le gène *PeqAbcb11* corrélées à une diminution de la sensibilité aux LMs.

2.4. La résistance aux LMs et la surexpression des transporteurs ABC chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*

2.4.1. *Caenorhabditis elegans* : un nématode modèle dans l'étude de la résistance.

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un organisme, de 1 mm à l'âge adulte, très facile à maintenir sur des géloses agar en laboratoire. La bactérie *Escherichia coli* est utilisée comme source de nourriture. Il existe deux formes sexuelles chez ce nématode : 99.5 % de la population sont des hermaphrodites et seulement 0.5 % sont des mâles qui résultent d'une mutation ponctuelle. Il possède un cycle de développement court. En moyenne, de l'œuf à l'adulte, il est de 3.5 jours. Un adulte hermaphrodite peut produire en moyenne entre 300 et 350 œufs. Le développement embryonnaire *in utero* se fait en 150 minutes et permet la division cellulaire jusqu'à l'étape « 4 cellules ». Une fois les œufs pondus, le développement embryonnaire *ex utero* dure 9 heures : l'œuf se développe alors du stade « gastrula » jusqu'à l'obtention d'un œuf mature. L'œuf éclos pour donner le premier stade larvaire appelé L1. La larve se développe ensuite en stades L2, L3 puis L4. Le stade L4 est le stade adulte qui permet la fécondation des œufs. Le cycle recommence. Un stade « dauer » dit de « résistance » existe chez ce nématode lorsque son organisme est soumis à des stress importants. C'est une forme de larve latente qui attend des conditions optimales pour reprendre le cycle de développement.

Son génome est de petite taille. Il est estimé à 100 millions de paires de bases réparties sur 5 autosomes et 1 chromosome X. Pour ces raisons, il a été choisi comme génome modèle pour

le « Genome Project » et a été le premier organisme animal à être totalement séquencé en 1998. Les cartes génétiques et physiques des 6 chromosomes de *C. elegans* ont été construites et annotées. Toutes ces informations sont accessibles via le « *C. elegans* database gateway » (ACeDB) (1998).

Durant le développement, les animaux restent transparents ce qui permet de suivre des évolutions phénotypiques visibles. Durant l'embryogenèse, 550 cellules sont produites. Ces cellules se divisent afin de donner un nombre connu invariable de 959 cellules chez l'hermaphrodite.

Cette connaissance fine de l'anatomie cellulaire de *C. elegans* a permis d'étudier plusieurs processus biologiques tels que la différenciation cellulaire, la formation en stade d'adulte ou encore l'embryogenèse. Plus de 40 % des gènes de nématodes parasites ont un fort niveau d'homologie avec les gènes de *C. elegans*. *C. elegans* ne possède pas seulement des similarités morphologiques mais aussi des caractéristiques identiques aux parasites de terrain : la cuticule protectrice, le stade d'adulte, l'adaptation à des conditions extrêmes (Hashmi et al., 2001)...

Toutes ces caractéristiques génétiques et phénotypiques font de ce nématode, un outil performant pour étudier la résistance chez les parasites.

2.4.2. La résistance à l'ivermectine chez *C. elegans*

Il existe dans la littérature, plusieurs souches de *C. elegans* résistants à l'ivermectine. La première correspond à des lignées ayant acquis la résistance à l'ivermectine par pression de sélection sans mutation sur la cible (James and Davey, 2009). Les auteurs ont sélectionnés deux lignées sur la base de leur résistance aux concentrations en ivermectine de 6 ng/ml (IVR6) et de 10 ng/ml (IVR10). Chez ces lignées, certains des transporteurs ABC sont surexprimés de façon constitutive comme *Abcb-1*, *Abcb-2* et *Abcc-1* chez IVR6 et *Abcb-2* et *Abcc-1* chez IVR10. Par ailleurs, d'autres transporteurs sont inductibles. Ainsi, *Abcb-1*, *Abcc-1* et *Abcc-6* sont induits chez les 2 lignées et *Abcb-2* l'est également chez la souche IVR10. En conclusion, *Abcb-1* et *Abcc-1* sont constitutivement surexprimés quelque soit le degré de résistance, tandis que *Abcc-6* est inductible (James and Davey, 2009). Ces lignées ont également développées une résistance croisée à d'autres anthelminthiques tels que la moxidectine, le lévamisole et le pyrantel. L'utilisation d'inhibiteurs connus d'ABC1 du mammifère entraîne une sensibilité accrue à l'ivermectine chez cette souche résistante, suggérant la participation de transporteurs ABC de nématode dans, la sensibilité à l'ivermectine chez les nématodes résistants.

Dans une autre étude, Yan *et al* confirme la surexpression de ces transporteurs ABC chez la lignée IVR10 et montre aussi une surexpression d'autres transporteurs tels que *Abcc-2*, *Abcc-4*, *Abcc-5*, *Abcc-7*, *Abcb-4*, *Abcb-12*, *Abcb-14*, *Haf-1*, *Haf-2* et *Haf-3* (Yan *et al.*, 2012).

Une autre souche de *C. elegans* résistant à l'ivermectine a été générée par mutation ciblée sur les 3 gènes codant pour les récepteurs glutamates (*avr-14/avr-15/glc1*) qui sont localisés au niveau du muscle du pharynx ou du système nerveux extra musculaire (Dent *et al.*, 2000). Ceci lui confère une résistance à l'ivermectine 4000 fois supérieure à celle de la souche parentale. En réponse à une exposition de 2.5 nM d'ivermectine, les expressions des gènes codant pour les 2/3 des transporteurs ABCBs sont induites. En effet, les expressions d'*Abcb1*, *Abcb4*, *Abcb5*, *Abcb7*, *Abcb9*, *Abcb11*, *Abcb12*, *Abcb13*, *Abcb14* et *Abcb15* sont induites. Dans ce modèle également, l'utilisation d'inhibiteurs d'ABCB1 connu chez le mammifère, augmente la sensibilité à l'ivermectine des nématodes résistants. Ainsi, ce modèle de résistance ciblée combiné à des approches expérimentales pour étudier les phénomènes de résistances non spécifiques via les transporteurs ABC montre l'importance de ces deux phénomènes dans la résistance à l'ivermectine.

2.4.3. Effet de l'absence des gènes codant pour les transporteurs ABC sur la sensibilité aux LMs

Des études menées chez le nématode modèle *C. elegans*, où les gènes codant pour certains transporteurs ABC ont été délétés, ont montré une sensibilité accrue aux LMs.

L'impact du knock-out des différents gènes codant pour les transporteurs MRPs lors d'une exposition à l'ivermectine et à la moxidectine a été étudié. L'augmentation de la sensibilité aux LMs chez les vers déficients en ABCC3, ABCC4 et ABCC6 montre que ces transporteurs jouent un rôle dans la tolérance à l'ivermectine mais aussi que ABCC6 et ABCC8 sont importants pour celle de la moxidectine (Ardelli and Prichard, 2008). Récemment, l'implication des ABCBs, dans la sensibilité à l'ivermectine chez *C. elegans* a été évaluée. En étudiant la fonction de pompe du pharynx et la motilité des vers, ils ont montré que la déficience en *Abcb-2*, *5*, *6*, *7*, *12* et *13* augmente la sensibilité à l'ivermectine (Ardelli, 2013). Une autre étude a montré que les effets les plus visibles sur la sensibilité à l'ivermectine sont observés chez les nématodes déficients en *Abcb-1*, *2*, *8*, *9*, *11* et *12* (Janssen *et al.*, 2013b). La résistance à la moxidectine a, quant à elle, été associée à l'absence de *Abcb6* (Bygarski *et al.*, 2014).

Tous ces résultats démontrent l'implication des transporteurs ABC dans la sensibilité et la résistance aux LMs.

2.5. La résistance aux LMs et la surexpression des transporteurs ABC chez les nématodes parasites

Plusieurs souches de parasites résistantes aux LMs ont été décrites. Les études réalisées sur différentes souches résistantes à l'ivermectine ainsi que sur différents isolats au sein d'une même espèce, mettent en évidence une surexpression de certains homologues des transporteurs ABC d'efflux de mammifères. Les gènes *Abcb-2* et *Abcb-9* chez *H. contortus*, *Abcb-9* chez *T. circumcincta* ainsi que *Haf-9* et *Abcc1* chez *C. oncophora*, sont constitutivement surexprimés dans les lignées résistantes. Lors d'une exposition à l'ivermectine et à la moxidectine, *Abcb-2* chez *H. contortus* et *Abcb-11* chez *O. volvulus* sont surexprimés chez les souches résistantes.

Le **Tableau 5** résume les résultats d'études mettant en évidence une surexpression des transporteurs ABC chez différents parasite résistants aux LMs.

Tableau 5 : Inventaire des études démontrant une surexpression des transporteurs ABC lors de résistance aux LMs chez les principaux helminthes parasites.

Nématodes	Isolats	LM	Gènes surexprimé		Stades	Références
			Constitutif	Induit		
<i>H. contortus</i>	MKIS/ PF14		Abcb-2	–	Adulte	(Xu et al., 1998)
	UGA/2004		Abcb2/ Abcb9	–	L3	(Williamson et al., 2011)
	–	IVM	–	Abcb-2	Adulte	(Lloberas et al., 2013)
<i>T. circumcincta</i>	MTci5		Tci-Abcb-9	–	Tous	(Dicker et al., 2011)
			Con-haf-9	–	oeuf	
			Con-mrp-1	–		
<i>C. oncophora</i>	CoIVR08	IVM	–	Con-Abcb-11	Adulte/L3	(De Graef et al., 2013)
		MOX	–	Con-Abcb-11	Adulte	
<i>P. equorum</i>	–		PeqAbcb-11		Pré-Adultes	(Janssen et al., 2013a)

Il est important de noter qu’aucune étude sur la surexpression des transporteurs ABC chez *O. volvulus* résistant aux LMs n’est disponible dans la littérature. Seule une étude suggère Abcb-1 comme jouant un rôle dans la sensibilité à l’ivermectine, car de faibles niveaux d’ARNm de ce transporteur ont été mis en évidence sur les stades larvaires sensibles, alors que des niveaux plus importants ont été retrouvés chez des adultes tolérants (Huang and Prichard, 1999). Comme vu précédemment, la piste du polymorphisme génique est d’avantage étudiée chez ce parasite.

2.6. Autres évidences génétiques lors de résistance aux LMs

2.6.1. Dyf-7

Une étude récente montre que le gène *dyf-7*, nécessaire pour le développement des neurones sensoriels des amphides chez le nématode, est impliqué dans la résistance à l'ivermectine (Urdaneta-Marquez et al., 2014). Une extinction de ce gène chez *C.elegans* est responsable d'un défaut morphologique des amphides et confère une perte de sensibilité aux LMs. Un enrichissement en haplotype pour ce gène a été reporté chez des isolats de *Haemonchus contortus* résistants aux LMs. Au sein de cette espèce, cet haplotype a été corrélé à un défaut des neurones sensoriels et associé à une diminution de l'expression de *Dyf-7*. Le fait que cet haplotype ait été retrouvé sur différents isolats de *H. contortus* répartis sur cinq continents différents, représente à l'heure actuelle un candidat potentiel comme marqueur moléculaire pour le diagnostic de la résistance aux LMs chez *H.contortus*.

2.6.2. Les miRNA

Récemment, les microRNAs qui sont de petits ARNs non codants impliqués dans la régulation des gènes à un niveau post transcriptionnels, ont été identifiés chez de nombreux parasites helminthes (Poole et al., 2010; Simoes et al., 2011; Winter et al., 2012). Alors que certains sont largement conservés dans une grande partie des organismes, d'autres sont décrits comme spécifiques d'une même espèce d'helminthes. L'activité ainsi que l'expression des miRNA sont souvent altérées dans les cellules cancéreuses et une quantité plus faible de ces miRNA est associée au développement de résistance via une surexpression des transporteurs ABC (Pan et al., 2009; Yu, 2009). L'implication des miRNA dans la surexpression des transporteurs ABC, observée chez les parasites de terrain résistants aux LMs, est méconnue. Toutefois, une puce à miRNAs a permis d'examiner les profils d'expression de souches de *C. elegans* et d'isolats d'*H. contortus* résistants à l'ivermectine. Leurs données initiales permettent d'identifier des modifications significatives d'expression de *mir-85* et *mir-788* chez *C. elegans* et de *mir-9551* chez *H. contortus* (Britton et al., 2014).

3. MECANISMES DE REGULATION DES TRANSPORTEURS ABC

La surexpression des transporteurs ABC d'efflux chez les organismes résistants aux LMs est un phénomène ubiquitaire. Comprendre les mécanismes de régulations des transporteurs ABC permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de résoudre les problèmes de baisse d'efficacité de ces médicaments. Il existe différentes voies de régulation des transporteurs ABC d'efflux. Nous ferons un état des lieux des régulations des transporteurs ABC d'efflux au niveau transcriptionnel, post transcriptionnel, traductionnel, post traductionnel et épigénétique.

3.1. Régulations transcriptionnelles

3.1.1. Rôle des facteurs de transcription

3.1.1.1. Les récepteurs nucléaires (RNs)

- Structure

Les RNs constituent le plus grand groupe de la famille des facteurs de transcriptions. On en compte 48 chez les humains. Ces facteurs de transcription sont activés par des ligands qui peuvent être des métabolites, des hormones, des vitamines ou encore des xénobiotiques. A l'état basal, le RN est lié à des co-répresseurs. La liaison directe du RN avec son ligand entraîne un changement conformationnel du récepteur, le RN passe alors d'un état inactif à actif. Ceci entraîne le recrutement de co-activateurs qui viennent remplacer les co-répresseurs. La transcription des gènes cibles est alors initiée. Tous les RNs partagent la même organisation structurale et sont composés de 6 domaines : A, B, C, D, E et F

La structure générale d'un récepteur nucléaire est divisée en plusieurs domaines (**Figure 10**).

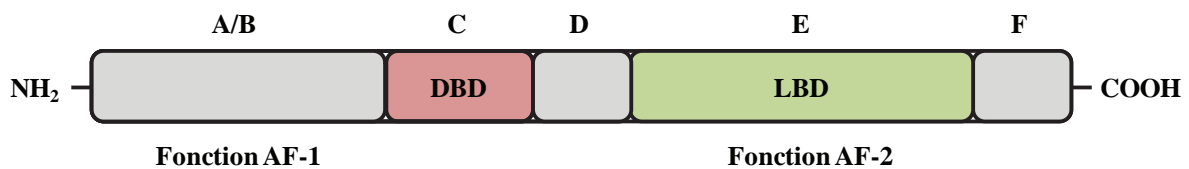


Figure 10 : Structure générale des récepteurs nucléaires

- Le domaine A/B qui se situe en N-terminal contient la fonction de transactivation (AF-1).
- Le domaine C contient le DNA-Binding Domain (DBD) qui est le domaine de liaison à l'ADN. C'est la région la plus conservée de la structure des RNs.
- Le domaine D est une région dite « charnière » qui est très peu conservée.
- Le domaine E comporte le Ligand-Binding Domain (LBD) qui est le domaine de liaison au ligand. Il contient l'autre fonction de transactivation (AF-2) qui est ligand-dépendante. Ce domaine de liaison au ligand est une des caractéristiques de cette famille de facteur de transcription.
- Le domaine F est un domaine encore méconnu.

Une des caractéristiques de ces récepteurs nucléaires est leur capacité à lier différents ligands tout en présentant un seul LBD. Cette particularité fait qu'un bon nombre de récepteurs nucléaires affichent une certaine promiscuité. Cette caractéristique ajoute un degré supplémentaire de complexité à la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression des gènes via les RNs.

- Classification

Les RNs sont classifiés en 6 sous familles (NR1-NR6) en fonction de leur homologie de séquence. Une septième classe, NR0, a été introduite. Elle est composée de 2 RNs, DAX-1 et SHP, qui ont la particularité de ne pas posséder de domaine NBD. Le **Tableau 6** représente la classification des différents RNs de mammifères.

Tableau 6 : Classification des RNs de mammifères

Nom officiel des sous familles	Groupe NRNC	Nom trivial	Nom officiel	Abbréviation	Ligand
NR0	B [DAX-like receptors (DAX, SHP)]	Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the chromosome, gene 1	NR0B1	DAX-1	Orphelin
		Short heterodimer partner	NR0B2	SHP	Orphelin
NR1	A	Thyroid hormone receptor α	NR1A1	TR α	GC-1, thyroid hormone
		Thyroid hormone receptor β	NR1A2	TR β	
	B	Retinoic acid receptor α	NR1B1	RAR α	Am 580, Acides rétinoïque et arotinoïde
		Retinoic acid receptor β	NR1B2	RAR β	
		Retinoic acid receptor γ	NR1B3	RAR γ	
	C	Peroxisome proliferator-activated receptor α	NR1C1	PPAR α	GW409544, GW6471, Acides pyrinixique, palmitique, Leukotriene B4
		Peroxisome proliferator-activated receptor β	NR1C2	PPAR β/δ	Acide eicosapentaenoïque, GW0742
		Peroxisome proliferator-activated receptor γ	NR1C3	PPAR γ	Rosiglitazone, GW1929, GW9662, GW409544, GW7647, 15-Deoxy- Δ -12,14-prostaglandin, 15-Deoxy- Δ -12, 14-PGJ2-
	D	Rev-erb α	NR1D1	Rev-erb α	Orphelin
		Rev-erb β	NR1D2	Rev-erb β	Orphelin
F	Retinoic acid receptor-related orphan receptor α	NR1F1	ROR α	Melatonine, CGP52608	
	Retinoic acid receptor-related orphan receptor β	NR1F2	ROR β		
	Retinoic acid receptor-related orphan receptor γ	NR1F3	ROR γ		

Nom officiel des sous familles	Groupe NRNC	Nom trivial	Nom officiel	Abbréviation	Ligand
NR1	H	Liver X receptor β	NR1H2	LXR β	GW3969, T0901317,, oxysterols GW4064, acides biliaires et chenodeoxycholique
		Liver X receptor α	NR1H3	LXR α	
		Farnesoid X receptor α	NR1H4	FXR α	
	I	Vitamin D3 Receptor	NR1I1	VDR	1,25-dihydroxyvitamine D3 Hyperforin, SR12813, rifampicine, pregnonolone carbonitrile, , T0901317, 24(S), 25-epoxycholesterol, butamben
		Pregnane X receptor	NR1I2	PXR	
		Constitutive androstane receptor	NR1I3	CAR	Androstanol, coenzyme A
NR2	A	Hepatocyte nuclear factor 4 α	NR2A1	HNF4 α	Palmitoyl coenzyme A
		Hepatocyte nuclear factor 4 γ	NR2A2	HNF4 γ	Orphelin
	B	Retinoid x receptor α	NR2B1	RXR α	LGD100268, GW0791, 9-acide rétinoïque
		Retinoid x receptor β	NR2B2	RXR β	LGD100268
		Retinoid x receptor γ	NR2B3	RXR γ	LGD100268
	C	Testis receptor 2	NR2C1	TR2	Orphelin
		Testis receptor 4	NR2C2	TR4	
	E	Tailless	NR2E2	TLL	Orphelin
		Photoreceptor-specific nuclear receptor	NR2E3	PNR	Orphelin

Nom officiel des sous familles	Groupe NRNC	Nom trivial	Nom officiel	Abbréviation	Ligand
NR2	F	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I	NR2F1	COUP-TFI	Orphelin
		Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II	NR2F2	COUP-TFII	Orphelin
NR3	A	Estrogen receptor	NR3A1	ER α	Fulvestrant 17 β -estradiol, 4-hydroxytamoxifen, Raloxifène
			NR3A2	ER β	
	B	Estrogen receptor-related receptor	NR3B1	ERR α	Orphelin
			NR3B2	ERR β	GSK4716, Diethylstilbestrol
			NR3B3	ERR γ	GSK4716, 4-hydroxy-tamoxifen
	C	Glucocorticoid receptor	NR3C1	GR	Dexamethasone, hydrocortisone, RU486
			Mineralocorticoid receptor	NR3C2	MR
		Progesteron receptor	NR3C3	PR	R5020, progesterone, RU486
Androgen receptor			NR3C4	AR	Dihydrotestosterone, RU486, Bicalutamide, R1881
NR4	A	Growth-factor-inducible immediate early gene Nur77	NR4A1	Nur77	Orphelin
		Nur-related protein 1	NR4A2	NURR1	Orphelin
		Neuron-derived orphan receptor 1	NR4A3	NOR1	Orphelin
NR5	A	Steroidogenic factor-1 / ELP	NR5A1	SF1	Orphelin
		Liver receptor homolog 1	NR5A2	LHR-1	Orphelin
NR6	A	Germ cell nuclear factor 1	NR6A1	GCNF1	Orphelin

Tableau adapté de (Polvani et al., 2014)

- Mode d'action

Ces facteurs de transcriptions sont activés par des ligands. Ces derniers sont de petites molécules hydrophobes qui se lient au domaine LBD. On peut citer les rétinoïdes, les acides gras, le cholestérol, les hormones, les vitamines mais aussi des molécules chimiques telles que les antibiotiques ou encore les xénobiotiques. La liaison du ligand induit un changement conformationnel du RN, lui permettant de se fixer aux éléments de réponse qui sont des séquences spécifiques de l'ADN. Les RNs peuvent agir en monomère, homodimère ou hétérodimères. L'activité transcriptionnelle finale dépend de la présence de co-activateurs ou de co-represseurs (Rosenfeld et al., 2006). Le mode d'action simplifié des RNs est présenté **Figure 11**.

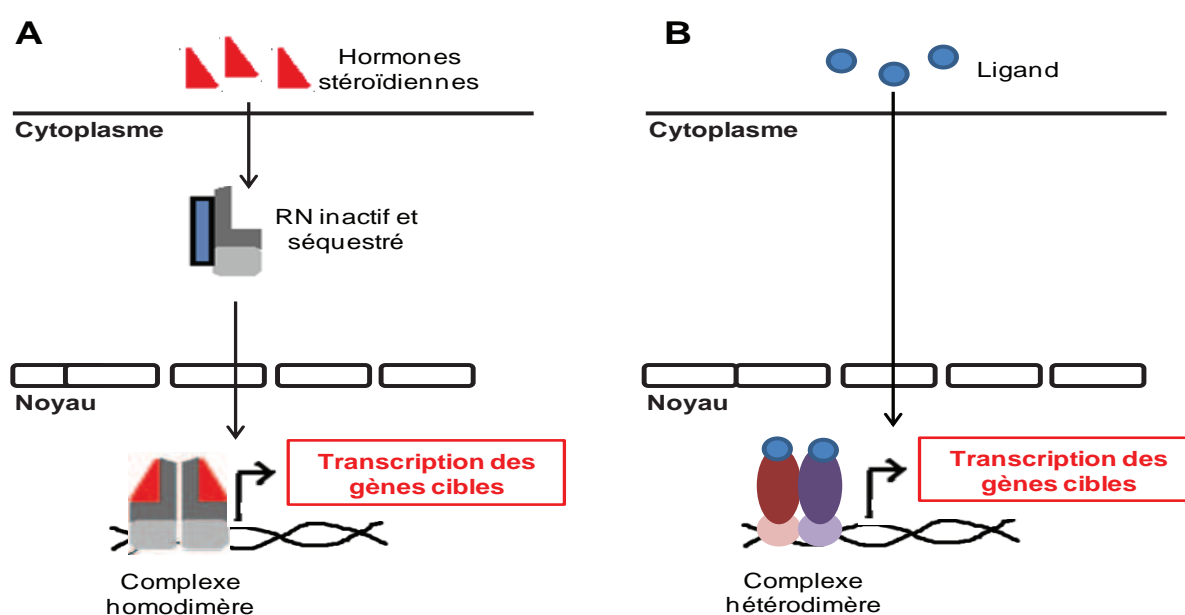


Figure 11 : Régulation transcriptionnelle simplifiée des transporteurs ABC par les RNs.

(A) Les Récepteurs nucléaires (RN) aux hormones stéroïdiennes sont des RNs inactifs et séquestrés dans le cytoplasme. Lorsque les hormones thyroïdiennes se fixent sur le RN, le complexe inhibiteur libère le RN qui transloque alors dans le noyau où il agit sous forme d'homodimère. (B) Les autres RNs sont majoritairement localisés dans le noyau. La liaison des ligands entraîne soit une homo- (comme c'est le cas pour les récepteurs aux hormones thyroïdiennes), soit une hétéro-dimérisation, qui entraînera une modulation de la transcription des gènes cibles.

3.1.1.1.1. Les RNs dans la régulation des transporteurs ABC d'efflux

Les RNs, notamment ceux appartenant à la famille NR1, jouent un rôle important dans la régulation des gènes codant pour les transporteurs ABC. Parmi eux, PXR, CAR, VDR et PPAR α sont des RNs appelés « xénocenseurs », c'est-à-dire que leurs ligands sont des xénobiotiques. Le **Tableau 7** présente pour chaque gène codant pour un transporteur ABC MDR, les RNs qui jouent un rôle dans sa régulation génique.

Tableau 7 : Les RNs dans la régulation des transporteurs ABC d'efflux impliqués dans le phénotype MDR

Gène	Recepteur nucléaire	Références
<i>ABCB1</i>	ER	(Arias et al., 2014)
	GR	(Narang et al., 2008)
	PXR	(Burk et al., 2005b; Cerveny et al., 2007; Geick et al., 2001; Harmsen et al., 2013; Jigorel et al., 2006; Rigalli et al., 2011; Wang et al., 2013b)
	CAR	(Burk et al., 2005a; Burk et al., 2005b; Cerveny et al., 2007; Jigorel et al., 2006; Lemmen et al., 2013a)
	TR	(Kurose et al., 2008)
<i>Abcb1</i>	LXR	(ElAli and Hermann, 2012)
	FXR	(Jiang et al., 2013)
	VDR	(Chow et al., 2011)
	PXR	(Maglich et al., 2002)
	CAR	
<i>Abcc1</i>	LXR	(ElAli and Hermann, 2012)
	CAR	(Maglich et al., 2002)
<i>ABCC2</i>	ER	(Arias et al., 2014)
	LXR	(Chisaki et al., 2009)
	FXR	(Kast et al., 2002)
	PXR	(Jigorel et al., 2006; Kast et al., 2002)
	CAR	(Jigorel et al., 2006; Kast et al., 2002)
	HNF4	(Qadri et al., 2009)
<i>Abcc2</i>	LXR	(Chisaki et al., 2009)
	PXR	(Johnson and Klaassen, 2002; Maglich et al., 2002)
	CAR	(Aleksunes and Klaassen, 2012; Guo et al., 2003; Maher et al., 2005)
	RXR	(Denson et al., 2002)

Gène	Recepteur nucléaire	Références
<i>ABCC3</i>	RAR	(Chen et al., 2007)
	FXR	(Schuetz et al., 2001)
	PXR	(Jigorel et al., 2006; Teng et al., 2003)
	RXR	(Chen et al., 2007)
<i>Abcc3</i>	PPAR	(Maher et al., 2005; Moffit et al., 2006)
	VDR	(McCarthy et al., 2005)
	PXR	(Aleksunes and Klaassen, 2012; Maher et al., 2005; Ogawa et al., 2000)
	CAR	(Cherrington et al., 2002; Guo et al., 2003; Maglich et al., 2002; Maher et al., 2005)
<i>Abcc4</i>	PPAR	(Aleksunes and Klaassen, 2012; Moffit et al., 2006)
	FXR	(Schuetz et al., 2001)
	CAR	(Aleksunes and Klaassen, 2012; Assem et al., 2004; Maher et al., 2005)
<i>ABCG2</i>	ER	(Hartz et al., 2012; Imai et al., 2005; Nakanishi and Ross, 2012)
	GR	(Honorat et al., 2008; Narang et al., 2008)
	PR	(Honorat et al., 2008; Wang et al., 2008; Wu et al., 2013)
	PPAR	(Szatmari et al., 2006)
	PXR	(Jigorel et al., 2006; Lemmen et al., 2013b)
	CAR	(Jigorel et al., 2006; Lemmen et al., 2013a)
<i>Abcg2</i>	PPAR	(Hirai et al., 2007)

ER : Estrogen Receptor, GR : Glucocorticoid receptor, PR: Progesterone Receptor, RAR : Retinoid Acid Receptor, PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, LXR: Liver X Receptor, RXR: Retinoid X Receptor, TR: Thyroid Hormone Receptor, BHE: Barrière hémato-Encéphalique.

3.1.1.2. Autres facteurs de transcriptions

Les transporteurs ABC d'efflux ne sont pas uniquement régulés par les RNs. En effet, d'autres facteurs de transcription peuvent aussi participer à leur régulation génique.

3.1.1.2.1. Le facteur de transcription Aryl hormone receptor (Ahr)

AhrR fait partie de la famille des facteurs de transcription nommée bHLH-Pas pour « basic Helix-Loop-Helix-Per-ARNT-Sim ». Cette famille doit son nom à 2 domaines caractéristiques. Le premier, en N-terminal, est composé de 10 à 13 acides aminés basiques qui permettent la liaison à l'ADN. Le second, en C-terminal, est caractérisé par la présence de 2 hélices α associées par une boucle β . Ce domaine permet la dimérisation du facteur de transcription. Son activité ressemble fortement à celle des récepteurs nucléaires : sa localisation intracellulaire, son activation ligand-dépendante, sa translocation nucléaire...

Il a été montré que Ahr régule, dans du tissu hépatique murin, *Abcc4* (Aleksunes and Klaassen, 2012) ainsi que *Abcc2*, *Abcc3*, *Abcc5* et *Abcc6* (Maher et al., 2005). Ahr, lorsqu'il est induit par la dioxine, régule l'expression de *ABCB1* et *ABCG2* dans une culture primaire d'hépatocytes humains (Jigorel et al., 2006).

3.1.1.2.2. Le facteur de transcription Nrf2

Nrf2 est un facteur de transcription de la famille bZIP pour « basic leucine zipper ». Ce facteur de transcription, contrairement aux RNs et à Ahr, ne s'active pas de façon ligand-dépendante. En effet, en conditions normales, Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par la protéine Keap1. Lors de stress oxydants, les résidus cystéine de Keap1 sont déstabilisés et entraîne sa dissociation de Nrf2. Nrf2 s'accumule alors librement dans le cytoplasme et transloque dans le noyau afin d'activer l'expression de ses gènes cibles.

Dans les tissus hépatiques, les gènes des transporteurs régulés par Nrf2 sont *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC6* et *ABCG2* (Aleksunes and Klaassen, 2012; Jigorel et al., 2006; Maher et al., 2005). Récemment, une étude a montré, *in vitro* et *in vivo*, que l'expression de *Abcb1*, *Abcc2* et *Abcg2* est aussi induite par Nrf2 au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Wang et al., 2014b).

3.1.1.2.3. Le facteur de transcription NF-kappa B

Son fonctionnement se rapproche de celui de Nrf2. En effet il est, lui aussi, séquestré dans le cytoplasme via une protéine i kappa b. Lorsque la protéine i kappa b est phosphorylée en

réponse à des signaux extérieurs, elle se dissocie de NF- κ B qui transloque alors dans le noyau.

Plusieurs études montrent l'implication de NF- κ B dans la régulation de l'expression des transporteurs ABCB1, ABCC2 et ABCG2. Une étude a notamment montré qu'il existe dans le premier intron de la région promotrice d'ABCB1, un site de fixation de NF- κ B entraînant l'expression de ce gène (Bentires-Alj et al., 2003). Plusieurs études récentes sur des cellules cancéreuses de différents tissus, prouvent l'implication de NF- κ B dans la surexpression de ces transporteurs (Li et al., 2014b; Wang et al., 2014a; Wang et al., 2013a).

3.1.1.2.4. Le facteur de transcription Hepatocyte Nuclear Factor-1 (HNF-1)

Comme son nom l'indique, ce facteur de transcription est majoritairement exprimé dans le foie. A ce jour, ce facteur de transcription a été décrit pour réguler uniquement *ABCC2* (Qadri et al., 2006).

3.1.2. Le dialogue complexe entre les différents facteurs de transcription

Chacune des voies de signalisation peut être connectée à une autre avec de nombreuses possibilités de dialogues. En effet de nombreuses études font état du dialogue possible entre les facteurs de transcription. Elles ont montré que certains facteurs de transcription peuvent réguler l'expression des gènes d'autres facteurs de transcriptions. On peut donc envisager que l'impact de l'activité transcriptionnelle d'un facteur de transcription sur ses gènes cibles ne dépendra pas que de lui même mais aussi des autres facteurs de transcriptions qui l'environnent.

Des exemples avérés de dialogue entre les différents facteurs de transcriptions sont présentés **Figure 12.**

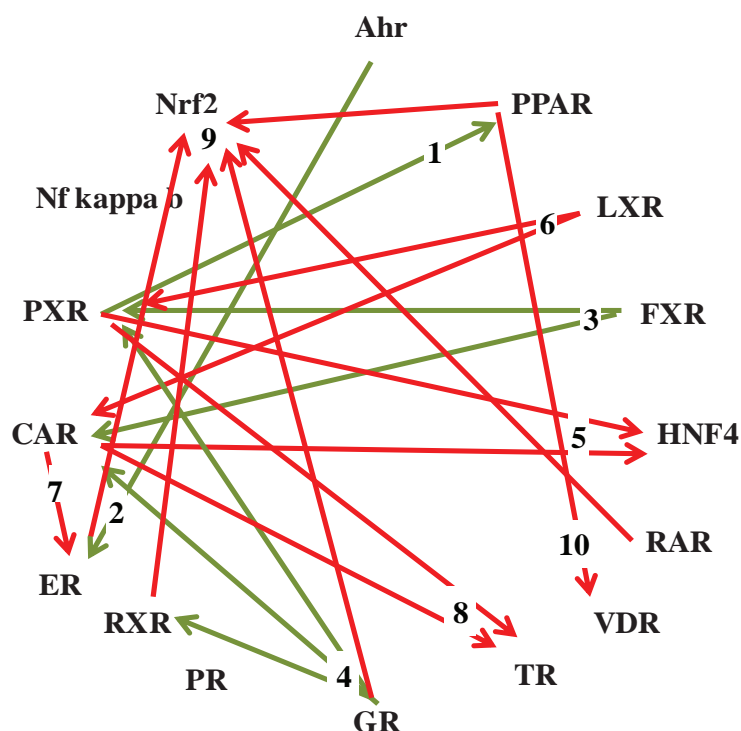


Figure 12 : Dialogue entre les différents facteurs de transcriptions connus pour réguler l'expression des transporteurs ABC d'efflux

Le rôle inducteur ou répresseur sur la régulation des facteurs de transcription est indiqué avec des flèches vertes ou rouges, respectivement. Les numéros indiquent les résultats démontrés de l'impact d'un facteur de transcription sur l'autre. **(1)** PPAR peut être induit par l'activation de PXR (Zhou et al., 2006). **(2)** Ahr peut se fixer aux éléments de réponse de RE et contrôler l'activité de ses gènes cibles (Ohtake et al., 2003; Safe and Wormke, 2003). **(3)** FXR et PXR ont des agonistes communs, FXR transactive les gènes cibles de CAR et PXR et contrôle l'expression de PXR (Jung et al., 2006; Kast et al., 2002). **(4)** GR contrôle l'expression de PXR, CAR et RXR (Pascussi et al., 2003; Pascussi et al., 2000). **(5)** L'activité de HNF-4 est inhibée par CAR et PXR via une compétition sur les éléments de réponse de HNF4 (Bhalla et al., 2004; Miao et al., 2006). **(6)** L'activité transcriptionnelle de CAR et PXR est inhibée par l'activation de LXR (Handschin et al., 2002). **(7)** CAR peut se fixer à ER et inhiber son activité transcriptionnelle (Min et al., 2002). **(8)** CAR, PXR et TR partagent des éléments de réponse, une baisse du niveau d'hormones thyroïdienne est observée en réponse aux xénobiotiques (Qatanani et al., 2005; Tien et al., 2007). **(9)** Nrf2 est inhibé par plusieurs RNs (Namani et al., 2014). **(10)** PPAR se fixe à VDR et inhibe la transactivation de VitD3 (Alimirah et al., 2012)

L'expression des gènes codant pour les transporteurs ABC est dépendante de nombreux récepteurs nucléaires et facteurs de transcriptions. A titre d'exemple, *ABCB1* dans l'intestin, peut être régulé par les facteurs de transcriptions TR, CAR, PXR ou encore ER.

3.2. Régulations épigénétiques

La plupart des phénomènes épigénétiques sont expliqués par des changements d'état de la chromatine. Parmi ces mécanismes épigénétiques, on retrouve la méthylation de l'ADN et la modification des histones comme par exemple l'acétylation.

Deux types de régulations épigénétiques sont impliquées dans la régulation des gènes codant pour les transporteurs ABC. La première correspond à la méthylation de l'ADN. Plusieurs études montrent que le statut de méthylation du promoteur du gène *ABCB1* est corrélé à l'activité transcriptionnelle du gène (Baker and El-Osta, 2004; Baker et al., 2005). Le second type de régulation épigénétique correspond à la modification des histones entraînant un changement de conformation au niveau du promoteur des gènes. Un grand nombre d'études indiquent que les inhibiteurs des histones déacétylases induisent l'expression de *Abcb1* et contribue ainsi au développement de résistance. Par exemple, un traitement à l'apicidine augmente l'efflux de la rhodamine et induit la résistance au paclitaxel dans les cellules Hela via la P-gp (Kim et al., 2008).

Il est important de noter que les deux mécanismes de régulation épigénétique peuvent jouer un rôle simultané dans la régulation des gènes. Une étude récente sur le cancer de la prostate montre que la répression de l'expression de *ABCB1* est majoritairement liée à des modifications post traductionnelle des histones ainsi qu'à une méthylation aberrante de l'ADN (Henrique et al., 2013).

3.3. Régulations post transcriptionnelles

Les microARNs appelés miRNAs sont des petits ARNs non codants impliqués dans la répression de l'expression des gènes à un niveau post-transcriptionnel. Ils induisent la dégradation des ARNm en se fixant au niveau de leur région 3'UTR (untranslated region).

Un grand nombre de miRNA ont été rapportés pour réguler l'expression des transporteurs ABC d'efflux. Récemment il a été montré, dans l'intestin, que le miR-145 régule l'expression de la P-gp en se fixant sur la région 3'-UTR de l'ARN messager du gène *ABCB1* (Ikemura et al., 2013). Le rôle des miRNAs dans la surexpression des transporteurs ABC dans des cellules résistantes aux drogues, dont notamment la P-glycoprotéine, a été massivement décrit (Bao et al., 2012; Bourguignon et al., 2009; Feng et al., 2011; Koturbash et al., 2012; Yang et al., 2012). En plus d'*ABCB1*, d'autres transporteurs ABC, tels que *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC4* et *ABCG2* sont aussi régulés par les miRNA (Jiao et al., 2013; Li et al., 2011; Pan et al., 2013; Turrini et al., 2012; Xu et al., 2012). Une revue récente fait état des lieux de la régulation des transporteurs ABC par ces petits ARNs (Ikemura et al., 2014).

La stabilité des ARNm a été mise en évidence dans la régulation de *ABCB1* et *ABCG2* (Lee, 2001; Ménez et al., 2012a; Rodrigues et al., 2009; Yague et al., 2003).

3.4. Régulations traductionnelles et post traductionnelles

Aucune régulation traductionnelle n'a été décrite dans la régulation des transporteurs ABC d'efflux.

Un seul mécanisme de régulation post-traductionnelle a été montré. Il s'agit de la phosphorylation des protéines. Peu d'études abordent ce mécanisme, toutefois il a été montré que les phosphorylations d'*ABCB1* (Stolarczyk et al., 2011), d'*ABCC2* (Wimmer et al., 2008) et d'*ABCG2* (Xie et al., 2008) sont requises pour assurer leur fonction de transport.

4. REGULATIONS DES TRANSPORTEURS ABC EN REPONSE AUX LMS

4.1. Transporteurs ABC régulés par les LMs

Des régulations des transporteurs ABC en réponse à une exposition aux LMs ont été observées au sein de plusieurs embranchements, tels que les protozoaires, les helminthes, les arthropodes et les mammifères.

En effet, chez une lignée hépatocytaire de souris, une exposition à l'ivermectine a entraîné la surexpression des deux 2 isoformes murins codant pour ABCB1 : *Abcb1a* et *Abcb1b* (Ménez et al., 2012a).

Chez les insectes, une exposition à l'ivermectine a induit l'expression d'*Abcb1* dans des cellules de drosophiles (Luo et al., 2013b). Chez le pou *Rhipicephalus microplus*, *Abcb10* est induit en réponse à l'ivermectine (Pohl et al., 2011). Une étude *in vitro* sur des cellules souches embryonnaires de ce même parasite ont récemment révélé les inductions d'*Abcc1* et *Abcb10* en réponse à l'ivermectine (Pohl et al., 2014). Chez une autre espèce de pou, parasite de l'homme, une brève exposition à l'ivermectine a entraîné l'induction de l'expression du transporteur *Abcc4* et est décrite pour être impliqué dans la tolérance à l'ivermectine au sein de cette espèce (Yoon et al., 2011). Chez le pou de mer *Lepeophtheirus salmonis*, 2 homologues de la famille ABCB du mammifères sont surexprimés lors d'une exposition à l'emamectine benzoate (Tribble et al., 2007), ainsi que lors de résistance à cette molécule (Igboeli et al., 2013).

Chez le nématode modèle *C.elegans* plusieurs études ont mis en évidence une induction des transporteurs ABC en réponse aux lactones macrocycliques. En effet, les expressions des transporteurs *Abcb1* et *Abcc1* ont été induites lors d'une exposition à l'ivermectine chez les lignées résistantes à l'ivermectine IVR6 et IVR10, ainsi qu'*Abcc2* chez la lignée IVR10 (James and Davey, 2009). Chez une autre lignée de *C. elegans* résistante à l'ivermectine par sa déficience en gène codant pour la cible aux LMs (*avr-14/avr-15/glc-1*), lors d'une exposition à la moxidectine, une surexpression de plusieurs transporteurs ABC, tel que *Abcc5*, *Abcb-12*, *Abcb-4* et *Abcb-15*, a été mise en évidence (Bygarski et al., 2014). Chez cette même lignée, une exposition à l'ivermectine a induit la surexpression de la plupart des transporteurs ABCB excepté *Abcb2*, *Abcb3*, *Abcb6*, *Abcb8* et *Abcb11* (Ardelli and Prichard, 2012). Il a également été montré chez *C. elegans* qu'une exposition à la moxidectine et à l'ivermectine induit l'expression de tous les ABCCs (Ardelli and Prichard, 2008).

Chez les parasites, il existe également une surexpression des transporteurs en réponse aux LMs (Cf Tableau 5 page 35).

4.2. Mécanismes de régulation connus des transporteurs ABC en réponse aux LMs

Peu de données sont disponibles quant aux mécanismes responsables de la modulation de leur expression génique en réponse à une exposition aux LMs. Toutefois, des mécanismes de régulations en réponse aux LMs ont été mis en évidence au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Au niveau transcriptionnel, l'ivermectine induit l'expression d'*ABCBI* via une activation de la voie NF- κ B (Luo et al., 2013b). L'induction de l'expression d'*ABCBI* chez une lignée de drosophile résistante à l'ivermectine est dépendante des voies d'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et d'Akt (Protéine kinase B) (Luo et al., 2013a).

Au niveau post-transcriptionnel, la surexpression des deux isoformes de la P-glycoprotéine chez des hépatocytes murins traités à l'ivermectine, est corrélée à la stabilisation de ses ARNs messagers (Ménez et al., 2012a).

5. OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux caractériser et comprendre les adaptations de l'hôte et du nématode en réponse à l'ivermectine. Ainsi les travaux expérimentaux ont été divisés en deux parties. Dans la première partie, les interactions de l'ivermectine avec les principales enzymes responsables de sa propre biotransformation et les mécanismes moléculaires transcriptionnels responsables de cette adaptation, ont été recherchés à la fois chez le mammifère et le nématode. Dans la deuxième partie, des associations thérapeutiques avec l'ivermectine ont été recherchées afin de potentialiser son efficacité chez le nématode.

Pour cela, nous avons choisi :

- D'étudier l'impact d'une exposition à l'ivermectine, *in vitro* sur un modèle de lignée cellulaire d'hépatocytes murins et *in vivo* chez la souris, sur l'expression des gènes codant pour les principaux transporteurs ABC et CYP 450s responsables de la biotransformation de l'ivermectine. Chez la souris, d'étudier l'impact de telles modulations géniques sur le devenir de l'ivermectine dans l'organisme en comparant l'impact d'une administration orale unique à des administrations répétées (**Chapitre 1**).
- De nous appuyer sur le modèle de lignée cellulaire d'hépatocytes afin de préciser les voies transcriptionnelles responsables de la surexpression d'*Abcb1a* et *Abcb1b* lors d'une exposition à l'ivermectine (Chapitre 2).
- De préciser les récepteurs nucléaires impliqués dans la sensibilité et le développement de la résistance à l'ivermectine chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* (**Chapitre 3**).
- De proposer des inhibiteurs des transporteurs ABC pour potentialiser l'efficacité de l'ivermectine chez le nématode : les flavonoïdes chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* (**Chapitre 4**) et l'ivermectine aglycone chez le nématode parasite *Teladorsagia circuminecta* (**Chapitre 5**).

RÉFÉRENCES

- 1998, Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, *Science* 282, 2012.
- Accardi, M.V., R.N. Beech and S.G. Forrester, 2012, Nematode cys-loop GABA receptors: biological function, pharmacology and sites of action for anthelmintics, *Invert Neurosci* 12, 3.
- Aleksunes, L.M. and C.D. Klaassen, 2012, Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice, *Drug Metab Dispos* 40, 1366.
- AlGusbi, S., J. Krucken, S. Ramunke, G. von Samson-Himmelstjerna and J. Demeler, 2014, Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes, *Int J Parasitol* 44, 647.
- Alimirah, F., X. Peng, L. Yuan, R.R. Mehta, A. von Knethen, D. Choubey and R.G. Mehta, 2012, Crosstalk between the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and the vitamin D receptor (VDR) in human breast cancer cells: PPARgamma binds to VDR and inhibits 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 mediated transactivation, *Exp Cell Res* 318, 2490.
- Alvinerie, M., J. Dupuy, C. Eeckhoutte and J.F. Sutra, 1999, Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil, *Parasitol Res* 85, 920.
- Alvinerie, M., J. Dupuy, S. Kiki-Mvouaka, J.F. Sutra and A. Lespine, 2008, Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep, *Vet Parasitol* 157, 117.
- Ardelli, B. and R. Prichard, 2008, Effects of Ivermectin and Moxidectin on the Transcription of Genes Coding for Multidrug Resistance Associated Proteins and Behaviour in *Caenorhabditis elegans*, *J Nematol* 40, 290.
- Ardelli, B.F., 2013, Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes, *Parasitol Int* 62, 639.
- Ardelli, B.F., S.B. Guerriero and R.K. Prichard, 2005, Genomic organization and effects of ivermectin selection on *Onchocerca volvulus* P-glycoprotein, *Mol Biochem Parasitol* 143, 58.
- Ardelli, B.F., S.B. Guerriero and R.K. Prichard, 2006, Ivermectin imposes selection pressure on P-glycoprotein from *Onchocerca volvulus*: linkage disequilibrium and genotype diversity, *Parasitology* 132, 375.
- Ardelli, B.F. and R.K. Prichard, 2004, Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa, *Ann Trop Med Parasitol* 98, 371.
- Ardelli, B.F. and R.K. Prichard, 2007, Reduced genetic variation of an *Onchocerca volvulus* ABC transporter gene following treatment with ivermectin, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101, 1223.
- Ardelli, B.F. and R.K. Prichard, 2012, Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin, *Vet Parasitol*.
- Arena, J.P., K.K. Liu, P.S. Pares, E.G. Frazier, D.F. Cully, H. Mrozik and J.M. Schaeffer, 1995, The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity, *J Parasitol* 81, 286.
- Arias, A., J.P. Rigalli, S.S. Villanueva, M.L. Ruiz, M.G. Luquita, V.G. Perdomo, M. Vore, V.A. Catania and A.D. Mottino, 2014, Regulation of expression and activity of multidrug resistance proteins MRP2 and MDR1 by estrogenic compounds in Caco-2 cells. Role in prevention of xenobiotic-induced cytotoxicity, *Toxicology* 320, 46.

- Artho, R., M. Schnyder, L. Kohler, P.R. Torgerson and H. Hertzberg, 2007, Ivermectin-resistance in gastrointestinal nematodes of Boer goats and Dorper sheep in Switzerland, *Vet Parasitol* 144, 68.
- Assem, M., E.G. Schuetz, M. Leggas, D. Sun, K. Yasuda, G. Reid, N. Zelcer, M. Adachi, S. Strom, R.M. Evans, D.D. Moore, P. Borst and J.D. Schuetz, 2004, Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice, *J Biol Chem* 279, 22250.
- Baker, E.K. and A. El-Osta, 2004, MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling, *Cancer Biol Ther* 3, 819.
- Baker, E.K., R.W. Johnstone, J.R. Zalberg and A. El-Osta, 2005, Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs, *Oncogene* 24, 8061.
- Ballent, M., A. Lifschitz, G. Virkel, J. Sallovitz and C. Lanusse, 2007, Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition, *J Vet Pharmacol Ther* 30, 242.
- Bao, L., S. Hazari, S. Mehra, D. Kaushal, K. Moroz and S. Dash, 2012, Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298, *Am J Pathol* 180, 2490.
- Bentires-Alj, M., V. Barbu, M. Fillet, A. Chariot, B. Relic, N. Jacobs, J. Gielen, M.P. Merville and V. Bours, 2003, NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells, *Oncogene* 22, 90.
- Bhalla, S., C. Ozalp, S. Fang, L. Xiang and J.K. Kemper, 2004, Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism, *J Biol Chem* 279, 45139.
- Blackhall, W.J., H.Y. Liu, M. Xu, R.K. Prichard and R.N. Beech, 1998, Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*, *Mol Biochem Parasitol* 95, 193.
- Bourguignon, L.Y., C.C. Spevak, G. Wong, W. Xia and E. Gilad, 2009, Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells, *J Biol Chem* 284, 26533.
- Bourguinat, C., B.F. Ardelli, S.D. Pion, J. Kamgno, J. Gardon, B.O. Duke, M. Boussinesq and R.K. Prichard, 2008, P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for ivermectin resistance selection in *Onchocerca volvulus*, *Mol Biochem Parasitol* 158, 101.
- Bourguinat, C., K. Keller, B. Blagburn, R. Schenker, T.G. Geary and R.K. Prichard, 2011, Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype, *Vet Parasitol* 176, 374.
- Britton, C., A.D. Winter, V. Gillan and E. Devaney, 2014, microRNAs of parasitic helminths - Identification, characterization and potential as drug targets, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 4, 85.
- Burk, O., K.A. Arnold, A. Geick, H. Tegude and M. Eichelbaum, 2005a, A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression, *Biol Chem* 386, 503.
- Burk, O., K.A. Arnold, A.K. Nussler, E. Schaeffeler, E. Efimova, B.A. Avery, M.A. Avery, M.F. Fromm and M. Eichelbaum, 2005b, Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor, *Mol Pharmacol* 67, 1954.
- Bygarski, E., R. Prichard and B. Ardelli, 2014, 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* 4, 143.
- Cervený, L., L. Svecová, E. Anzenbacherová, R. Vrzal, F. Staud, Z. Dvorak, J. Ulrichová, P. Anzenbacher and P. Pavek, 2007, Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways, *Drug Metab Dispos* 35, 1032.
- Chartier, C., F. Soubirac, I. Pors, A. Silvestre, J. Hubert, C. Couquet and J. Cabaret, 2001, Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France, *J Helminthol* 75, 325.
- Chen, W., S.Y. Cai, S. Xu, L.A. Denson, C.J. Soroka and J.L. Boyer, 2007, Nuclear receptors RXR α :RAR α are repressors for human MRP3 expression, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1221.
- Cherrington, N.J., D.P. Hartley, N. Li, D.R. Johnson and C.D. Klaassen, 2002, Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats, *J Pharmacol Exp Ther* 300, 97.
- Chisaki, I., M. Kobayashi, S. Itagaki, T. Hirano and K. Iseki, 2009, Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver, *Biochim Biophys Acta* 1788, 2396.
- Chow, E.C., M.R. Durk, C.L. Cummins and K.S. Pang, 2011, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ up-regulates P-glycoprotein via the vitamin D receptor and not farnesoid X receptor in both *fxr*($-/-$) and *fxr*($+/+$) mice and increased renal and brain efflux of digoxin in mice in vivo, *J Pharmacol Exp Ther* 337, 846.
- De Graef, J., J. Demeler, P. Skuce, M. Mitreva, G. Von Samson-Himmelstjerna, J. Vercruysse, E. Claerebout and P. Geldhof, 2013, Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora* isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones, *Parasitology* 140, 499.
- Demeler, J., J. Krucken, S. AlGusbi, S. Ramunke, J. De Graef, D. Kerboeuf, P. Geldhof, W.E. Pomroy and G. von Samson-Himmelstjerna, 2013, Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*, *Mol Biochem Parasitol* 188, 10.
- Denson, L.A., A. Bohan, M.A. Held and J.L. Boyer, 2002, Organ-specific alterations in RAR α :RXR α abundance regulate rat Mrp2 (*Abcc2*) expression in obstructive cholestasis, *Gastroenterology* 123, 599.
- Dicker, A.J., A.J. Nisbet and P.J. Skuce, 2011, Gene expression changes in a P-glycoprotein (*Tci-pgp-9*) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*, *Int J Parasitol* 41, 935.
- Dickson, M. and J.P. Gagnon, 2004, The cost of new drug discovery and development, *Discov Med* 4, 172.
- El-Abdellati, A., J. De Graef, A. Van Zeveren, A. Donnan, P. Skuce, T. Walsh, A. Wolstenholme, A. Tait, J. Vercruysse, E. Claerebout and P. Geldhof, 2011, Altered *avr-14B* gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*, *Int J Parasitol* 41, 951.
- El-Abdellati, A., P. Geldhof, E. Claerebout, J. Vercruysse and J. Charlier, 2010, Monitoring macrocyclic lactone resistance in *Cooperia oncophora* on a Belgian cattle farm during four consecutive years, *Vet Parasitol* 171, 167.
- ElAli, A. and D.M. Hermann, 2012, Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells, *Brain Pathol* 22, 175.

- Eng, J.K. and R.K. Prichard, 2005, A comparison of genetic polymorphism in populations of *Onchocerca volvulus* from untreated- and ivermectin-treated patients, *Mol Biochem Parasitol* 142, 193.
- Feng, D.D., H. Zhang, P. Zhang, Y.S. Zheng, X.J. Zhang, B.W. Han, X.Q. Luo, L. Xu, H. Zhou, L.H. Qu and Y.Q. Chen, 2011, Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia, *J Cell Mol Med* 15, 2164.
- Fisher, M.H. and H. Mrozik, 1992, The chemistry and pharmacology of avermectins, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32, 537.
- Fitzpatrick, J.L., 2013, Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists, *Vet Parasitol* 195, 233.
- Gasbarre, L.C., 2014, Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US, *Vet Parasitol* 204, 3.
- Gasbarre, L.C., L.L. Smith, J.R. Lichtenfels and P.A. Pilitt, 2009, The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US, *Vet Parasitol* 166, 281.
- Geary, T.G., 2005, Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug, *Trends Parasitol* 21, 530.
- Geary, T.G., C. Bourguinat and R.K. Prichard, 2011, Evidence for macrocyclic lactone anthelmintic resistance in *Dirofilaria immitis*, *Top Companion Anim Med* 26, 186.
- Geick, A., M. Eichelbaum and O. Burk, 2001, Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin, *J Biol Chem* 276, 14581.
- Geurden, T., H. Hoste, P. Jacquiet, D. Traversa, S. Sotiraki, A. Frangipane di Regalbono, N. Tzanidakis, D. Kostopoulou, C. Gaillac, S. Privat, A. Giangaspero, C. Zanardello, L. Noe, B. Vanimisetti and D. Bartram, 2014, Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy, *Vet Parasitol* 201, 59.
- Gonzalez-Canga, A., N. Fernandez-Martinez, A. Sahagun-Prieto, M.J. Diez-Liebana, M. Sierra-Vega and J.J. Garcia-Vieitez, 2009, A review of the pharmacological interactions of ivermectin in several animal species, *Curr Drug Metab* 10, 359.
- Guo, G.L., G. Lambert, M. Negishi, J.M. Ward, H.B. Brewer, Jr., S.A. Kliewer, F.J. Gonzalez and C.J. Sinal, 2003, Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity, *J Biol Chem* 278, 45062.
- Handschin, C., M. Podvynec, R. Amherd, R. Looser, J.C. Ourlin and U.A. Meyer, 2002, Cholesterol and bile acids regulate xenosensor signaling in drug-mediated induction of cytochromes P450, *J Biol Chem* 277, 29561.
- Harmsen, S., I. Meijerman, R.F. Maas-Bakker, J.H. Beijnen and J.H. Schellens, 2013, PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors, *Eur J Pharm Sci* 48, 644.
- Hartz, A.M., E.K. Madole, D.S. Miller and B. Bauer, 2012, Estrogen receptor beta signaling through phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 down-regulates blood-brain barrier breast cancer resistance protein, *J Pharmacol Exp Ther* 334, 467.
- Hashmi, S., W. Tawe and S. Lustigman, 2001, *Caenorhabditis elegans* and the study of gene function in parasites, *Trends Parasitol* 17, 387.
- Hassan, M.U., M.N. Khan, M. Abubakar, H.M. Waheed, Z. Iqbal and M. Hussain, 2010, Bovine hypodermosis--a global aspect, *Trop Anim Health Prod* 42, 1615.
- Henrique, R., A.I. Oliveira, V.L. Costa, T. Baptista, A.T. Martins, A. Morais, J. Oliveira and C. Jeronimo, 2013, Epigenetic regulation of MDR1 gene through post-translational histone modifications in prostate cancer, *BMC Genomics* 14, 898.

- Herrero, M. and P.K. Thornton, 2013, Livestock and global change: emerging issues for sustainable food systems, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20878.
- Heumann, J., S. Carmichael, J.E. Bron, A. Tildesley and A. Sturm, 2012, Molecular cloning and characterisation of a novel P-glycoprotein in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*, *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 155, 198.
- Hirai, T., Y. Fukui and K. Motojima, 2007, PPAR α agonists positively and negatively regulate the expression of several nutrient/drug transporters in mouse small intestine, *Biol Pharm Bull* 30, 2185.
- Honorat, M., A. Mesnier, A. Di Pietro, V. Lin, P. Cohen, C. Dumontet and L. Payen, 2008, Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 375, 308.
- Huang, Y.J. and R.K. Prichard, 1999, Identification and stage-specific expression of two putative P-glycoprotein coding genes in *Onchocerca volvulus*, *Mol Biochem Parasitol* 102, 273.
- Hugnet, C., A. Lespine and M. Alvinerie, 2007, Multiple oral dosing of ketoconazole increases dog exposure to ivermectin, *J Pharm Pharm Sci* 10, 311.
- Igboeli, O.O., J.F. Burka and M.D. Fast, 2013, Sea lice population and sex differences in P-glycoprotein expression and emamectin benzoate resistance on salmon farms in the Bay of Fundy, New Brunswick, Canada, *Pest Manag Sci* 70, 905.
- Ikemura, K., T. Iwamoto and M. Okuda, 2014, MicroRNAs as regulators of drug transporters, drug-metabolizing enzymes, and tight junctions: implication for intestinal barrier function, *Pharmacol Ther* 143, 217.
- Ikemura, K., M. Yamamoto, S. Miyazaki, H. Mizutani, T. Iwamoto and M. Okuda, 2013, MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells, *Mol Pharmacol* 83, 399.
- Imai, Y., E. Ishikawa, S. Asada and Y. Sugimoto, 2005, Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2, *Cancer Res* 65, 596.
- James, C.E. and M.W. Davey, 2009, Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*, *Int J Parasitol* 39, 213.
- Janssen, I.J., J. Krucken, J. Demeler, M. Basiaga, S. Kornas and G. von Samson-Himmelstjerna, 2013a, Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility, *PLoS One* 8, e61635.
- Janssen, I.J., J. Krucken, J. Demeler and G. von Samson-Himmelstjerna, 2013b, *Caenorhabditis elegans*: modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains, *Exp Parasitol* 134, 171.
- Jiang, Y., J. Jin, P. Iakova, J.C. Hernandez, N. Jawanmardi, E. Sullivan, G.L. Guo, N.A. Timchenko and G.J. Darlington, 2013, Farnesoid X receptor directly regulates xenobiotic detoxification genes in the long-lived Little mice, *Mech Ageing Dev* 134, 407.
- Jiao, X., L. Zhao, M. Ma, X. Bai, M. He, Y. Yan, Y. Wang, Q. Chen, X. Zhao, M. Zhou, Z. Cui, Z. Zheng, E. Wang and M. Wei, 2013, MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), *Breast Cancer Res Treat* 139, 717.
- Jigorel, E., M. Le Vee, C. Boursier-Neyret, Y. Parmentier and O. Fardel, 2006, Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes, *Drug Metab Dispos* 34, 1756.

- Johnson, D.R. and C.D. Klaassen, 2002, Regulation of rat multidrug resistance protein 2 by classes of prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription pathways, *Toxicol Sci* 67, 182.
- Jung, D., D.J. Mangelsdorf and U.A. Meyer, 2006, Pregnane X receptor is a target of farnesoid X receptor, *J Biol Chem* 281, 19081.
- Kaplan, R.M., T.R. Klei, E.T. Lyons, G. Lester, C.H. Courtney, D.D. French, S.C. Tolliver, A.N. Vidyashankar and Y. Zhao, 2004, Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms, *J Am Vet Med Assoc* 225, 903.
- Kaplan, R.M. and A.N. Vidyashankar, 2012, An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance, *Vet Parasitol* 186, 70.
- Kast, H.R., B. Goodwin, P.T. Tarr, S.A. Jones, A.M. Anisfeld, C.M. Stoltz, P. Tontono, S. Kliewer, T.M. Willson and P.A. Edwards, 2002, Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor, *J Biol Chem* 277, 2908.
- Kerboeuf, D. and J. Aycardi, 1999, Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity, *Parasitol Res* 85, 713.
- Kiki-Mvouaka, S., C. Menez, C. Borin, F. Lyazrhi, M. Foucaud-Vignault, J. Dupuy, X. Collet, M. Alvinerie and A. Lespine, 2010, Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: A comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice, *Drug Metab Dispos* 38, 573.
- Kim, Y.K., N.H. Kim, J.W. Hwang, Y.J. Song, Y.S. Park, D.W. Seo, H.Y. Lee, W.S. Choi, J.W. Han and S.N. Kim, 2008, Histone deacetylase inhibitor apicidin-mediated drug resistance: involvement of P-glycoprotein, *Biochem Biophys Res Commun* 368, 959.
- Koturbash, I., F.A. Beland and I.P. Pogribny, 2012, Role of microRNAs in the regulation of drug metabolizing and transporting genes and the response to environmental toxicants, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 8, 597.
- Kotze, A.C., A.P. Ruffell, M.R. Knox and G.A. Kelly, 2014, Relative potency of macrocyclic lactones in in vitro assays with larvae of susceptible and drug-resistant Australian isolates of *Haemonchus contortus* and *H. placei*, *Vet Parasitol* 203, 294.
- Kurose, K., M. Saeki, M. Tohkin and R. Hasegawa, 2008, Thyroid hormone receptor mediates human MDR1 gene expression-Identification of the response region essential for gene expression, *Arch Biochem Biophys* 474, 82.
- Kwa, M.S., J.G. Veenstra and M.H. Roos, 1994, Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1, *Mol Biochem Parasitol* 63, 299.
- Kwei, G.Y., R.F. Alvaro, Q. Chen, H.J. Jenkins, C.E. Hop, C.A. Keohane, V.T. Ly, J.R. Strauss, R.W. Wang, Z. Wang, T.R. Pippert and D.R. Umbenhauer, 1999, Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in mdr1a P-glycoprotein, *Drug Metab Dispos* 27, 581.
- Laffont, C.M., P.L. Toutain, M. Alvinerie and A. Bousquet-Melou, 2002, Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat, *Drug Metab Dispos* 30, 626.
- Laing, R., T. Kikuchi, A. Martinelli, I.J. Tsai, R.N. Beech, E. Redman, N. Holroyd, D.J. Bartley, H. Beasley, C. Britton, D. Curran, E. Devaney, A. Gilabert, M. Hunt, F. Jackson, S.L. Johnston, I. Kryukov, K. Li, A.A. Morrison, A.J. Reid, N. Sargison, G.I. Saunders, J.D. Wasmuth, A. Wolstenholme, M. Berriman, J.S. Gilleard and J.A. Cotton, 2013, The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery, *Genome Biol* 14, R88.
- Laing, S.T., A. Ivens, V. Butler, S.P. Ravikumar, R. Laing, D.J. Woods and J.S. Gilleard, 2012, The transcriptional response of *Caenorhabditis elegans* to Ivermectin exposure

- identifies novel genes involved in the response to reduced food intake, *PLoS One* 7, e31367.
- Le Jambre, L.F., I.J. Lenane and A.J. Wardrop, 1999, A hybridisation technique to identify anthelmintic resistance genes in *Haemonchus*, *Int J Parasitol* 29, 1979.
- Lee, C.H., 2001, Induction of P-glycoprotein mRNA transcripts by cycloheximide in animal tissues: evidence that class I Pgp is transcriptionally regulated whereas class II Pgp is post-transcriptionally regulated, *Mol Cell Biochem* 216, 103.
- Lemmen, J., I.E. Tozakidis, P. Bele and H.J. Galla, 2013a, Constitutive androstane receptor upregulates *Abcb1* and *Abcg2* at the blood-brain barrier after CITCO activation, *Brain Res* 1501, 68.
- Lemmen, J., I.E. Tozakidis and H.J. Galla, 2013b, Pregnane X receptor upregulates ABC-transporter *Abcg2* and *Abcb1* at the blood-brain barrier, *Brain Res* 1491, 1.
- Lespine, A., M. Alvinerie, J. Vercruyse, R.K. Prichard and P. Geldhof, 2008, ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics, *Trends Parasitol* 24, 293.
- Lespine, A., J. Dupuy, S. Orłowski, T. Nagy, H. Glavinas, P. Krajcsi and M. Alvinerie, 2006, Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3), *Chem Biol Interact* 159, 169.
- Lespine, A., S. Martin, J. Dupuy, A. Roulet, T. Pineau, S. Orłowski and M. Alvinerie, 2007, Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship, *Eur J Pharm Sci* 30, 84.
- Li, X., Y.Z. Pan, G.M. Seigel, Z.H. Hu, M. Huang and A.M. Yu, 2011, Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (*hsa-miR-328*, *-519c* and *-520h*) and their differential expression in stem-like ABCG2⁺ cancer cells, *Biochem Pharmacol* 81, 783.
- Li, Y., L. Huang, X. Zeng, G. Zhong, M. Ying, M. Huang and H. Bi, 2014, Down-regulation of P-gp expression and function after Mulberroside A treatment: potential role of protein kinase C and NF-kappa B, *Chem Biol Interact* 213, 44.
- Lifschitz, A., G. Virkel, J. Sallovitz, F. Imperiale, A. Pis and C. Lanusse, 2002, Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle, *J Vet Pharmacol Ther* 25, 111.
- Lloberas, M., L. Alvarez, C. Entrocasso, G. Virkel, M. Ballent, L. Mate, C. Lanusse and A. Lifschitz, 2013, Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3, 20.
- Luo, L., Y.J. Sun and Y.J. Wu, 2013a, Abamectin resistance in *Drosophila* is related to increased expression of P-glycoprotein via the dEGFR and dAkt pathways, *Insect Biochem Mol Biol* 43, 627.
- Luo, L., Y.J. Sun, L. Yang, S. Huang and Y.J. Wu, 2013b, Avermectin induces P-glycoprotein expression in S2 cells via the calcium/calmodulin/NF-kappaB pathway, *Chem Biol Interact* 203, 430.
- Maglich, J.M., C.M. Stoltz, B. Goodwin, D. Hawkins-Brown, J.T. Moore and S.A. Kliewer, 2002, Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification, *Mol Pharmacol* 62, 638.
- Maher, J.M., X. Cheng, A.L. Slitt, M.Z. Dieter and C.D. Klaassen, 2005, Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver, *Drug Metab Dispos* 33, 956.
- Martinez-Valladares, M., P. Geldhof, N. Jonsson, F.A. Rojo-Vazquez and P. Skuce, 2012, *Teladorsagia circumcincta*: Molecular characterisation of the *avr-14B* subunit and its relatively minor role in ivermectin resistance, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2, 154.

- McArthur, C.L., D.J. Bartley, D.J. Shaw and J.B. Matthews, 2011, Assessment of ivermectin efficacy against gastrointestinal nematodes in cattle on four Scottish farms, *Vet Rec* 169, 658.
- McCarthy, T.C., X. Li and C.J. Sinal, 2005, Vitamin D receptor-dependent regulation of colon multidrug resistance-associated protein 3 gene expression by bile acids, *J Biol Chem* 280, 23232.
- McCavera, S., T.K. Walsh and A.J. Wolstenholme, 2007, Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers, *Parasitology* 134, 1111.
- McKellar, Q.A. and H.A. Benchaoui, 1996, Avermectins and milbemycins, *J Vet Pharmacol Ther* 19, 331.
- McKellar, Q.A. and C. Gokbulut, 2012, Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones, *Curr Pharm Biotechnol* 13, 888.
- McKenna, P.B., 1997, Anthelmintic treatment and the suppression of egg production in gastro-intestinal nematodes of sheep and cattle: fact or fallacy?, *N Z Vet J* 45, 173.
- Mealey, K.L., S.A. Bentjen, J.M. Gay and G.H. Cantor, 2001, Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene, *Pharmacogenetics* 11, 727.
- Ménez, C., L. Mselli-Lakhal, M. Foucaud-Vignault, P. Balaguer, M. Alvinerie and A. Lespine, 2012, Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line, *Biochem Pharmacol* 83, 269.
- Miao, J., S. Fang, Y. Bae and J.K. Kemper, 2006, Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 α , *J Biol Chem* 281, 14537.
- Min, G., H. Kim, Y. Bae, L. Petz and J.K. Kemper, 2002, Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). CAR inhibits ER-mediated signaling pathway by sequestrating p160 coactivators, *J Biol Chem* 277, 34626.
- Moffit, J.S., L.M. Aleksunes, J.M. Maher, G.L. Scheffer, C.D. Klaassen and J.E. Manautou, 2006, Induction of hepatic transporters multidrug resistance-associated proteins (Mrp) 3 and 4 by clofibrate is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α , *J Pharmacol Exp Ther* 317, 537.
- Molento, M.B., A. Lifschitz, J. Sallovitz, C. Lanusse and R. Prichard, 2004, Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep, *Parasitol Res* 92, 121.
- Nakanishi, T. and D.D. Ross, 2012, Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression, *Chin J Cancer* 31, 73.
- Namani, A., Y. Li, X.J. Wang and X. Tang, 2014, Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer, *Biochim Biophys Acta* 1843, 1875.
- Narang, V.S., C. Fraga, N. Kumar, J. Shen, S. Throm, C.F. Stewart and C.M. Waters, 2008, Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier, *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C440.
- Njue, A.I. and R.K. Prichard, 2004, Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*, *Parasitology* 129, 741.
- Ogawa, K., H. Suzuki, T. Hirohashi, T. Ishikawa, P.J. Meier, K. Hirose, T. Akizawa, M. Yoshioka and Y. Sugiyama, 2000, Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G438.
- Ohtake, F., K. Takeyama, T. Matsumoto, H. Kitagawa, Y. Yamamoto, K. Nohara, C. Tohyama, A. Krust, J. Mimura, P. Chambon, J. Yanagisawa, Y. Fujii-Kuriyama and S. Kato, 2003, Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor, *Nature* 423, 545.

- Pan, Y.Z., M.E. Morris and A.M. Yu, 2009, MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells, *Mol Pharmacol* 75, 1374.
- Pan, Y.Z., A. Zhou, Z. Hu and A.M. Yu, 2013, Small nucleolar RNA-derived microRNA hsa-miR-1291 modulates cellular drug disposition through direct targeting of ABC transporter ABCC1, *Drug Metab Dispos* 41, 1744.
- Pascussi, J.M., M. Busson-Le Coniat, P. Maurel and M.J. Vilarem, 2003, Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element, *Mol Endocrinol* 17, 42.
- Pascussi, J.M., L. Drocourt, J.M. Fabre, P. Maurel and M.J. Vilarem, 2000, Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators, *Mol Pharmacol* 58, 361.
- Pohl, P.C., D.D. Carvalho, S. Daffre, S. Vaz Ida, Jr. and A. Masuda, 2014, In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism, *Vet Parasitol* 204, 316.
- Pohl, P.C., G.M. Klafke, D.D. Carvalho, J.R. Martins, S. Daffre, I. da Silva Vaz, Jr. and A. Masuda, 2011, ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Int J Parasitol* 41, 1323.
- Polvani, S., M. Tarocchi, S. Tempesti and A. Galli, 2014, Nuclear receptors and pathogenesis of pancreatic cancer, *World J Gastroenterol* 20, 12062.
- Poole, C.B., P.J. Davis, J. Jin and L.A. McReynolds, 2010, Cloning and bioinformatic identification of small RNAs in the filarial nematode, *Brugia malayi*, *Mol Biochem Parasitol* 169, 87.
- Prichard, R., C. Menez and A. Lespine, 2012, Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2, 134.
- Qadri, I., L.J. Hu, M. Iwahashi, S. Al-Zuabi, L.C. Quattrochi and F.R. Simon, 2009, Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2), *Toxicol Appl Pharmacol* 234, 281.
- Qadri, I., M. Iwahashi, G.A. Kullak-Ublick and F.R. Simon, 2006, Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 mediate hepatic multidrug resistance protein 2 up-regulation during hepatitis C virus gene expression, *Mol Pharmacol* 70, 627.
- Qatanani, M., J. Zhang and D.D. Moore, 2005, Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism, *Endocrinology* 146, 995.
- Rigalli, J.P., M.L. Ruiz, V.G. Perdomo, S.S. Villanueva, A.D. Mottino and V.A. Catania, 2011, Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells, *Toxicology* 285, 18.
- Rodrigues, A.C., R. Curi, M.H. Hirata and R.D. Hirata, 2009, Decreased ABCB1 mRNA expression induced by atorvastatin results from enhanced mRNA degradation in HepG2 cells, *Eur J Pharm Sci* 37, 486.
- Rosenfeld, M.G., V.V. Lunyak and C.K. Glass, 2006, Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response, *Genes Dev* 20, 1405.
- Roulet, A., O. Puel, S. Gesta, J.F. Lepage, M. Drag, M. Soll, M. Alvinerie and T. Pineau, 2003, MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin, *Eur J Pharmacol* 460, 85.
- Safe, S. and M. Wormke, 2003, Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action, *Chem Res Toxicol* 16, 807.

- Sangster, N.C., S.C. Bannan, A.S. Weiss, S.C. Nulf, R.D. Klein and T.G. Geary, 1999, *Haemonchus contortus*: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from P-glycoproteins, *Exp Parasitol* 91, 250.
- Sargison, N.D., F. Jackson, D.J. Bartley, D.J. Wilson, L.J. Stenhouse and C.D. Penny, 2007, Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland, *Vet Parasitol* 145, 65.
- Sargison, N.D., F. Jackson, D.J. Wilson, D.J. Bartley, C.D. Penny and J.S. Gilleard, 2010, Characterisation of milbemycin-, ivermectin-, imidazothiazole- and benzimidazole-resistant *Teladorsagia circumcincta* from a sheep flock, *Vet Rec* 166, 681.
- Schinkel, A.H., J.J. Smit, O. van Tellingen, J.H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol, M.A. van der Valk, E.C. Robanus-Maandag, H.P. te Riele and et al., 1994, Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs, *Cell* 77, 491.
- Schinkel, A.H., E. Wagenaar, C.A. Mol and L. van Deemter, 1996, P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs, *J Clin Invest* 97, 2517.
- Schuetz, E.G., S. Strom, K. Yasuda, V. Lecureur, M. Assem, C. Brimer, J. Lamba, R.B. Kim, V. Ramachandran, B.J. Komoroski, R. Venkataramanan, H. Cai, C.J. Sinal, F.J. Gonzalez and J.D. Schuetz, 2001, Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450, *J Biol Chem* 276, 39411.
- Scott, E.W., P. Baxter and J. Armour, 1991, Fecundity of anthelmintic resistant adult *Haemonchus contortus* after exposure to ivermectin or benzimidazoles in vivo, *Res Vet Sci* 50, 247.
- Sharom, F.J., 2008, ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance, *Pharmacogenomics* 9, 105.
- Sheps, J.A., S. Ralph, Z. Zhao, D.L. Baillie and V. Ling, 2004, The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes, *Genome Biol* 5, R15.
- Shoop, W.L., D.A. Ostlind, S.P. Rohrer, G. Mickle, H.W. Haines, B.F. Michael, H. Mrozik and M.H. Fisher, 1995, Ivermectins and milbemycins against *Fasciola hepatica*: in vivo drug efficacy and in vitro receptor binding, *Int J Parasitol* 25, 923.
- Simoes, M.C., J. Lee, A. Djikeng, G.C. Cerqueira, A. Zerlotini, R.A. da Silva-Pereira, A.R. Dalby, P. LoVerde, N.M. El-Sayed and G. Oliveira, 2011, Identification of *Schistosoma mansoni* microRNAs, *BMC Genomics* 12, 47.
- Stitt, L.E., J.B. Tompkins, L.A. Dooley and B.F. Ardelli, 2011, ABC transporters influence sensitivity of *Brugia malayi* to moxidectin and have potential roles in drug resistance, *Exp Parasitol* 129, 137.
- Stolarczyk, E.I., C.J. Reiling and C.M. Paumi, 2011, Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases, *Curr Pharm Biotechnol* 12, 621.
- Szakacs, G., A. Varadi, C. Ozvegy-Laczka and B. Sarkadi, 2008, The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox), *Drug Discov Today* 13, 379.
- Szatmari, I., G. Vamosi, P. Brazda, B.L. Balint, S. Benko, L. Szeles, V. Jeney, C. Ozvegy-Laczka, A. Szanto, E. Barta, J. Balla, B. Sarkadi and L. Nagy, 2006, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells, *J Biol Chem* 281, 23812.
- Teng, S., V. Jekerle and M. Piquette-Miller, 2003, Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators, *Drug Metab Dispos* 31, 1296.
- Tien, E.S., K. Matsui, R. Moore and M. Negishi, 2007, The nuclear receptor constitutively active/androstane receptor regulates type 1 deiodinase and thyroid hormone activity in the regenerating mouse liver, *J Pharmacol Exp Ther* 320, 307.

- Tompkins, J.B., L.E. Stitt, A.M. Morrisette and B.F. Ardelli, 2011, The role of *Brugia malayi* ATP-binding cassette (ABC) transporters in potentiating drug sensitivity, *Parasitol Res* 109, 1311.
- Tribble, N.D., J.F. Burka and F.S. Kibenge, 2007, Evidence for changes in the transcription levels of two putative P-glycoprotein genes in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in response to emamectin benzoate exposure, *Mol Biochem Parasitol* 153, 59.
- Turrini, E., S. Haenisch, S. Laechelt, T. Diewock, O. Bruhn and I. Cascorbi, 2012, MicroRNA profiling in K-562 cells under imatinib treatment: influence of miR-212 and miR-328 on ABCG2 expression, *Pharmacogenet Genomics* 22, 198.
- Urdaneta-Marquez, L., S.H. Bae, P. Janukavicius, R. Beech, J. Dent and R. Prichard, 2014, A *dyf-7* haplotype causes sensory neuron defects and is associated with macrocyclic lactone resistance worldwide in the nematode parasite *Haemonchus contortus*, *Int J Parasitol*.
- van Wyk, J.A. and F.S. Malan, 1988, Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa, *Vet Rec* 123, 226.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., W.J. Blackhall, J.S. McCarthy and P.J. Skuce, 2007, Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes, *Parasitology* 134, 1077.
- Wang, H., E.W. Lee, L. Zhou, P.C. Leung, D.D. Ross, J.D. Unadkat and Q. Mao, 2008, Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells, *Mol Pharmacol* 73, 845.
- Wang, L., C. Wang, J. Peng, Q. Liu, Q. Meng, H. Sun, X. Huo, P. Sun, X. Yang, Y. Zhen and K. Liu, 2014a, Dioscin enhances methotrexate absorption by down-regulating MDR1 in vitro and in vivo, *Toxicol Appl Pharmacol* 277, 146.
- Wang, Q.P., Y. Wang, X.D. Wang, X.M. Mo, J. Gu, Z.Y. Lu, Z.L. Pan and Y.X. Zhu, 2013a, Survivin up-regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP) through attenuating the suppression of p53 on NF-kappaB expression in MCF-7/5-FU cells, *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2036.
- Wang, X., C.R. Campos, J.C. Peart, L.K. Smith, J.L. Boni, R.E. Cannon and D.S. Miller, 2014b, Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers, *J Neurosci* 34, 8585.
- Wang, Y.M., W. Lin, S.C. Chai, J. Wu, S.S. Ong, E.G. Schuetz and T. Chen, 2013b, Piperine activates human pregnane X receptor to induce the expression of cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1, *Toxicol Appl Pharmacol* 272, 96.
- Williamson, S.M., B. Storey, S. Howell, K.M. Harper, R.M. Kaplan and A.J. Wolstenholme, 2011, Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*, *Mol Biochem Parasitol* 180, 99.
- Wimmer, R., S. Hohenester, T. Pusl, G.U. Denk, C. Rust and U. Beuers, 2008, Tauroursodeoxycholic acid exerts anticholestatic effects by a cooperative cPKC alpha-/PKA-dependent mechanism in rat liver, *Gut* 57, 1448.
- Winter, A.D., W. Weir, M. Hunt, M. Berriman, J.S. Gilleard, E. Devaney and C. Britton, 2012, Diversity in parasitic nematode genomes: the microRNAs of *Brugia pahangi* and *Haemonchus contortus* are largely novel, *BMC Genomics* 13, 4.
- Wolstenholme, A.J. and A.T. Rogers, 2005, Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics, *Parasitology* 131 Suppl, S85.
- Wu, X., X. Zhang, L. Sun, H. Zhang, L. Li, X. Wang, W. Li, P. Su, J. Hu, P. Gao and G. Zhou, 2013, Progesterone negatively regulates BCRP in progesterone receptor-positive human breast cancer cells, *Cell Physiol Biochem* 32, 344.

- Xie, Y., K. Xu, D.E. Linn, X. Yang, Z. Guo, H. Shimelis, T. Nakanishi, D.D. Ross, H. Chen, L. Fazli, M.E. Gleave and Y. Qiu, 2008, The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells, *J Biol Chem* 283, 3349.
- Xu, K., X. Liang, K. Shen, D. Cui, Y. Zheng, J. Xu, Z. Fan, Y. Qiu, Q. Li, L. Ni and J. Liu, 2012, miR-297 modulates multidrug resistance in human colorectal carcinoma by down-regulating MRP-2, *Biochem J* 446, 291.
- Xu, M., M. Molento, W. Blackhall, P. Ribeiro, R. Beech and R. Prichard, 1998, Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog, *Mol Biochem Parasitol* 91, 327.
- Yague, E., A.L. Armesilla, G. Harrison, J. Elliott, A. Sardini, C.F. Higgins and S. Raguz, 2003, P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation, *J Biol Chem* 278, 10344.
- Yan, R., L. Urdaneta-Marquez, K. Keller, C.E. James, M.W. Davey and R.K. Prichard, 2012, The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*, *Vet Parasitol* 190, 519.
- Yang, L., N. Li, H. Wang, X. Jia, X. Wang and J. Luo, 2012, Altered microRNA expression in cisplatin-resistant ovarian cancer cells and upregulation of miR-130a associated with MDR1/P-glycoprotein-mediated drug resistance, *Oncol Rep* 28, 592.
- Yoon, K.S., J.P. Strycharz, J.H. Baek, W. Sun, J.H. Kim, J.S. Kang, B.R. Pittendrigh, S.H. Lee and J.M. Clark, 2011, Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance, *Insect Mol Biol* 20, 687.
- Yu, A.M., 2009, Role of microRNAs in the regulation of drug metabolism and disposition, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5, 1513.
- Zeng, Z., N.W. Andrew, B.H. Arison, D. Luffer-Atlas and R.W. Wang, 1998, Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes, *Xenobiotica* 28, 313.
- Zeng, Z., N.W. Andrew, M.L. Green-Erwin and B.A. Halley, 1996, Fate of 4"-epiacetylamino-4"-deoxyivermectin B1 in rats, *Drug Metab Dispos* 24, 572.
- Zeng, Z., N.W. Andrew and B.A. Halley, 1997, Identification of cytochrome P4503A as the major enzyme sub-family responsible for the metabolism of 22,23-dihydro-13-O-[(2-methoxyethoxy)methyl]-ivermectin B1 aglycone by rat liver microsomes, *Xenobiotica* 27, 985.
- Zhao, Z., J.A. Sheps, V. Ling, L.L. Fang and D.L. Baillie, 2004, Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*, *J Mol Biol* 344, 409.
- Zhou, J., Y. Zhai, Y. Mu, H. Gong, H. Uppal, D. Toma, S. Ren, R.M. Evans and W. Xie, 2006, A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway, *J Biol Chem* 281, 15013.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

PARTIE 1

CHAPITRE 1

**ETUDE DES REGULATIONS DE L'EXPRESSION DES GENES DES
SYSTEMES DE DETOXIFICATION DE L'IVERMECTINE CHEZ
L'HOTE**

Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes *in vitro* and *in vivo* in mice

Il est nécessaire de connaître l'impact d'une exposition à l'ivermectine sur les gènes codant pour les enzymes responsables de la détoxification des médicaments quand on sait que lorsqu'elles sont induites, une diminution de la concentration du composé parental actif est responsable d'une moindre efficacité du médicament. Cet article décrit les effets de l'ivermectine *in vitro* sur une lignée hépatocytaire murine mais aussi *in vivo* au niveau de l'intestin et du foie de la souris, en comparant les effets d'une administration unique à ceux d'administrations répétées afin de mimer les plans thérapeutiques actuels.

L'effet de l'ivermectine sur l'expression des gènes codant pour les enzymes de biotransformation a été évalué par qRT-PCR. Les gènes étudiés *in vitro* et *in vivo* comprennent ceux codant pour les principaux transporteurs ABC d'efflux et cytochromes impliqués dans l'efflux et le métabolisme de l'ivermectine : *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Abcc1*, *Abcc2*, *Abcc3*, *Abcg2*, *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b10* et *Cyp3a11*. L'impact de l'effet de l'ivermectine sur ses propres systèmes de détoxification a été évalué *in vivo* en dosant la quantité d'ivermectine et de son métabolite principal dans le plasma et les tissus.

Cette étude a montré que l'ivermectine induit une augmentation de l'expression de la plupart des gènes codant pour les enzymes de biotransformation *in vitro*. *In vivo*, aucun effet n'est observé à la suite d'une administration unique. Les effets les plus marqués sont retrouvés au niveau de la muqueuse intestinale à la suite d'administrations répétées d'ivermectine pour les gènes *Abcb1a*, *Abcc2*, *Cyp1a1* et *Cyp2b10*. Ces inductions d'expression des gènes codant pour des transporteurs ABC ou des cytochromes ont conduit à une moindre concentration en ivermectine chez la souris et à une augmentation de la quantité du métabolite principal de l'ivermectine.



Molecular and cellular pharmacology

Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes *in vitro* and *in vivo* in miceMélanie Albérich^{a,b,1}, Cécile Ménez^{a,b,*}, Jean-François Sutra^{a,b}, Anne Lespine^{a,b}^a Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1331 INRA/INP, Toxalim Research Center in Food Toxicology, 180 chemin de Tournefeuille - BP 93173, F-31027 Toulouse Cedex 3, France^b Université de Toulouse, INP, UMR 1331, Toxalim, F- 31000 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2014
Received in revised form
24 June 2014
Accepted 26 June 2014

Keywords:

ABC transporters
Cytochromes
Gene regulation
Ivermectin
Macrocyclic lactonesChemical compounds studied in this article:
Ivermectin (PubChem CID 6427057)

ABSTRACT

The biodisposition of the antiparasitic drug ivermectin in host and parasite is decisive for its efficacy and strongly depends on the efflux by ATP-Binding Cassette (ABC) transporters and on its biotransformation by cytochromes P450. The purpose of this study was to evaluate, *in vitro* and *in vivo*, the ivermectin ability in modulating the expression of the most important genes involved in drug detoxification. Gene expression of ABC transporters and cytochromes was evaluated by RT-qPCR in murine hepatic and intestinal cell lines exposed to increasing ivermectin doses, and in liver and intestine of mice orally administered with single or repeated therapeutic doses of ivermectin (0.2 mg/kg). Plasma, brain, liver and intestinal concentrations of ivermectin and its main metabolite were measured by HPLC in ivermectin-treated mice. In hepatocyte cell line, ivermectin up-regulated expression of *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Abcc2*, *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b10*; while *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Abcg2*, *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b10* and *Cyp3a11* levels were induced in intestinal cell line. In mice, repeated administration of ivermectin induced the expression of *Abcb1a*, *Abcc2*, *Cyp1a1* and *Cyp2b10* in intestine while only *Cyp3a11* was induced in liver. Compared with single administration, repeated ivermectin administration lowered plasma, liver and intestine drug concentration, while increasing main metabolite content in plasma and intestine. These findings can be regarded as a warning that repeated ivermectin exposure is able to induce detoxification systems in mammals that may lead to subtherapeutic drug concentration. This may also be an important consideration in the assessment of drug–drug interaction and toxicity for other ABC transporters and CYP450s substrates.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ivermectin belongs to a large family of broad-spectrum anti-parasitic drugs named macrocyclic lactones. It remains the leading worldwide antiparasitic agent active against endo- and ecto-parasites, widely used in veterinary and human medicine. Its extensive tissue distribution, low biotransformation and high plasma-gastrointestinal recycling make ivermectin efficient for a long period.

The ability of the active drug to reach parasites and therefore the final concentration of the drug in the parasite is a key determinant for its efficacy. Furthermore, it has been demonstrated that ivermectin reaches the parasites from the gastrointestinal contents and from plasma (Lloberas et al., 2012) and that the antiparasitic activity is related to the drug concentration in the target tissue (Lifschitz et al., 1999a, 2000). Drug concentration in the host organism is the result of several processes including the absorption, the distribution, the metabolism and prolonged period elimination. Several proteins of the detoxification system are central to all these processes. Biotransformation by cytochromes and drug efflux by ABC transporters are recognized as important determinants for the disposition kinetics of numerous pharmacological agents. Ivermectin is metabolized to a small extent by some cytochromes P450 isoforms such as CYP1A and CYP3A into polar 24-Hydroxymethyl, 26-Hydroxymethyl and 3'-O-Demethyl derivatives (Zeng et al., 1997, 1996b). Ivermectin is also a substrate of P-glycoprotein (ABCB1, PGP1) (Pouliot et al., 1997), a transporter belonging to the ATP-binding cassette (ABC) family that pumps a broad range of endogenous and xenobiotic compounds out of the

* Corresponding author at: Institut National de la Recherche Agronomique, UMR 1331 INRA/INP, Toxalim Research Center in Food Toxicology, 180 chemin de Tournefeuille - BP 93173, F-31027 Toulouse Cedex 3, France. Tel.: +33 561285152; fax: +33 561285310.

E-mail addresses: melanie.alberich@toulouse.inra.fr (M. Albérich), cecile.menez@toulouse.inra.fr (C. Ménez), jean-francois.sutra@toulouse.inra.fr (J.-F. Sutra), anne.lespine@toulouse.inra.fr (A. Lespine).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.052>

0014-2999/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

cell in an energy-dependant manner (Schinkel and Jonker, 2003). PGP1 therefore supports the essential of ivermectin elimination via intestinal excretion (Laffont et al., 2002). It is well established that modulation of the activity of PGP1 can strongly influence the pharmacokinetics, the efficacy and the safety of PGP1 substrates (Giacomini et al., 2010), including ivermectin (Lespine et al., 2008). Moreover, ivermectin interacts with ABC2 (Lespine et al., 2006) and ABCG2 (Jani et al., 2011) suggesting a possible contribution of these proteins in the transport and elimination of the drug.

Drug exposure can result in the induction of the expression of detoxification systems, particularly those participating in the metabolism of the inducing agent. This is the case for ivermectin which induces ABCB1 gene expression in murine hepatic cells (Ménez et al., 2012) and CYP1A, 2B and 3A protein expressions and activities in mouflons (Skalova et al., 2001). In addition, ivermectin induces gene expression of ABCB1 homologs in nematodes resistant to ivermectin (Lespine et al., 2012). In this context, it is important to study the changes of systems of detoxification in response to exposure to a drug, as they may impact on the drug concentration in the organisms, and hence its therapeutic index.

The aim of this work was to evaluate the impact of ivermectin exposure on the expression of drug detoxification genes and on the drug kinetics. Firstly, the effect of ivermectin exposure on genes encoding the most important ABC efflux transporters and CYPs involved in drug disposition was evaluated in hepatic and intestinal cell lines, these cells being recognized as suitable *in vitro* models for studying the potential of xenobiotics to modulate ABC transporters and drug metabolizing enzymes gene expression (Carriere et al., 2001; Donato et al., 2008; Sinz et al., 2008). Secondly, the impact of single and repeated therapeutic oral administration of ivermectin on the expression of genes encoding those detoxification systems was assessed *in vivo* in mice. Finally, a relationship between detoxification genes expression profile and ivermectin biodisposition in mice was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

in vivo studies were conducted in mice under European laws on the protection of animals (86/609/EEC). Protocols are performed under procedure and principal for good clinical practice (CVMP/VICH 59598). The protocols for experimentation on rodents used in this manuscript have been approved by the local institutional animal care and ethics committee which is the "Direction Départementale des Services Vétérinaires de Haute-Garonne". The specific approval number for this study approval is B31555-25.

2.2. Materials

Dimethylsulfoxide (DMSO), trifluoroacetic anhydride, *N*-methylimidazole of analytical reagent grade and ivermectin were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St. Quentin Fallavier, France). Acetonitrile and methanol (HPLC grade) were obtained from Thermo Fisher Scientific (Loughborough, UK). Glacial acetic acid (10%) was purchased from Merck (Clevenot, Chelles, France). Pic B7 low UV was purchased from Waters (Guyancourt, France). Ivermectin (Oramec[®]) was obtained from Merial (Lyon, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), glutamine, penicillin-streptomycin solution (10,000 units/ml penicillin and 10,000 µg/ml of streptomycin), trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA) and Trizol Reagent were obtained from Invitrogen – Life Technologies (Cergy Pontoise, France). Tissue culture plastic flasks and culture plates

were supplied by Sarstedt (Orsay, France). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

2.3. Cell cultures and treatments

JWZ murine hepatic cell line was kindly provided by Dr. L. Mselli-Lakhal (Toxalim, Toulouse, France) and was used according Ref. Ménez et al. (2012). This hepatocyte cell line, also referred to as MuSH immortalized hepatocytes (Tien et al., 2003), derives from wild-type mice and expresses PPAR alpha at a standard level and the nuclear receptor CAR at a low level (Eveillard et al., 2009; Ménez et al., 2012). These cells, as well as most hepatocyte-derived cell lines currently used for biotransformation studies (Donato et al., 2008), express low levels of Cyp3a11 compared with the mRNA levels of Cyp1a1, Cyp1a2 and Cyp2b10, thus limiting the biotransformation process of CYP3A11 substrate drugs such as ivermectin and reducing the biotransformation of the parental drug into metabolites. Mouse intestinal epithelial CMT-93 cell line was kindly provided by Dr. F. Pierre (Toxalim, Toulouse, France). JWZ and CMT93 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. JWZ and CMT93 cells were kept in 5% CO₂ and 95% humidity at 34 °C and 37 °C, respectively. Every 3–4 days, cells were trypsinized and seeded at 5 × 10⁵ cells per 6-well cluster trays for induction studies. The cells were grown at more than 80% confluence and exposed to ivermectin at 1, 5 or 10 µM or to the vehicle for 24 h. Ivermectin was dissolved in DMSO at a final concentration of 0.1% (v/v). For all the experimental conditions used, cell viability was checked using the MTT colorimetric assay (Mosmann, 1983), and protein level was determined by using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), as previously described (Ménez et al., 2012). Cells were then harvested, mRNA was isolated, and modulation of detoxification systems mRNA expression was quantified by real-time qRT-PCR.

2.4. Animals and treatments

FVB mice were from Taconic Farms (Germantown, NY). Animals were kept under controlled temperature with 12/12 h light/dark cycle. They received *ad libitum* a standard diet (Harlan Teklad TRM Rat/Mouse Diet; Harlan Teklad, Gannat, France) and municipal water. 8 week-old female mice were weighed and randomly assigned to groups (*n*=16). Mice received by gavage either a single or repeated administration of ivermectin or the corresponding vehicle. Four mice per group were used. Repeated treatment consisted in two administrations per week during 5 weeks, treatment being administered the same day from week to week. All treated animals received by gavage a solution prepared from commercial ivermectin oral formulation (0.1% Oramec; Merial, France). Before administration, ivermectin stock solution was diluted in water to a final concentration of 0.006 % in order to administer to each mouse a dose of 0.2 mg/kg body weight (bw) in 100 µl. The formulation was checked for drug concentration prior to administration. Mice were weighed before drug administration and the volume of formulation administered was calculated taking into account the mouse weight to ensure accurately the dose of 0.2 mg/kg of ivermectin. No adverse effects of the treatment were observed in the two groups throughout the experimental period.

2.5. Blood and organ sampling

Mice were anesthetized 48 h after the last administration with a Ketamine/Xylazine intraperitoneal injection (100 and 10 mg/kg, respectively) and heparinized blood samples were collected from the orbital sinus vein. Immediately thereafter, mice were killed by

cervical dislocation and liver, intestine and brain were rapidly removed. Blood samples were centrifuged at 1500g for 10 min at 4 °C and the plasma fraction was collected and stored at –20 °C until HPLC analysis. Tissues were weighed, washed in saline solution, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –20 °C until HPLC analysis or –80 °C until total RNA extraction.

2.6. Drug and metabolite extraction and analytical procedures

Ivermectin concentration was determined in plasma, liver, intestine and brain by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection according to previously described and validated method (Alvinerie et al., 1998; Lifschitz et al., 2000). In brief, plasma and tissues were homogenized in acetonitrile (1:1, v/v or 1:2, v/w, respectively). Samples were centrifuged at 2000g, and the supernatant was applied to a Supelco C18 cartridge (Supelco) by using automated solid phase extraction. The extraction recoveries were 0.95 for plasma and 0.77 for tissues. The eluate was evaporated, and the dry extract was processed to obtain a fluorophore derivative by dissolving it in N-methylimidazole and trifluoroacetic anhydride solutions. Samples were injected into the HPLC system [PU 980 pump (Jasco, Tokyo, Japan), 360 automatic injector (Kontron, Paris, France), and RF-551 fluorescence detector (Shimadzu, Kyoto, Japan)]. A supelcosil LC18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used with acetic acid (0.2% in water)-methanol:acetonitrile (4:40:56, v/v/v) as the mobile phase. Using these conditions, retention times of ivermectin and its main metabolite were detected at 12.2 and 6.5 min respectively. The metabolite percentage was calculated as the ratio of the peak area of metabolite relatively to ivermectin.

2.7. Total RNA isolation and RT-PCR analysis

2.7.1. Isolation of RNA and cDNA synthesis

Total RNA from cultured cells and tissues was extracted using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using a nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). RNA purity was checked by measurement of the A260/280 nm ratio, which was routinely in the range of 1.8–2.0. cDNA was synthesized from 2 μg of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems – Life Technologies, Courtaboeuf, France).

2.7.2. Quantification of mRNA expression by RT-qPCR

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using an ABI Prism 7300 Sequence Detection System instrument and software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Gene-specific primers for SYBR Green assays are described in Table 1. All primers were designed using Primer Express software version 2.0 (Applied

Biosystems) and synthesized by Invitrogen (Cergy Pontoise, France). All primers were entered into the NCBI Blast program to ensure specificity. Results were expressed using the comparative Ct method as described in User Bulletin 2 (Applied Biosystem). Briefly, the ΔC_t values were calculated in every sample for each gene of interest as following: $C_t \text{ gene of interest} - C_t \text{ reference gene}$. With TATA-box binding protein (TBP) as the reference gene. The fold change in the level of target mRNA between treated and untreated samples was then expressed as $2^{-\Delta C_t}$ with $\Delta C_t \pm S.D.$ where S.D. is the standard deviation of the mean of the ΔC_t value. A dissociation curve allowed us to verify the specificity of the amplification.

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tuckey post-test to compare the effect of ivermectin over control, while individual comparisons between pairs of data were performed using the Mann–Whitney test (GraphPad Instat, San Diego, CA, USA). Data are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). Statistical significance was accepted as $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of ivermectin on ABC efflux transporters and cytochromes P450 mRNA expression in hepatocyte and intestinal cell lines

We first examined whether ivermectin was able to modulate the expression of detoxification genes in JWZ mouse hepatocyte and CMT93 mouse intestinal cell lines. Cells were treated for 24 h with increasing concentrations of ivermectin and the expression of genes encoding the major ABC transporters and the most important CYPs involved in ivermectin metabolism was analyzed. The dose-response relationship for ivermectin effects toward *Abcb1a/1b* (MDR1, PGP1), *Abcc1* (ABCC1), *Abcc2* (ABCC2), *Abcc3* (ABCC3), *Abcg2* (ABCG2), *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b10* and *Cyp3a11* is shown in Fig. 1. The ivermectin-induced modulation was different from one gene to another and was concentration- and tissue-dependent. Low concentration of ivermectin such as 1 μM failed to obviously alter expression of transporters, except for *Cyp2b10* which was slightly but significantly increased (1.5-fold, $P < 0.01$) in CMT93 cells. When higher concentrations were used, several gene mRNA levels were significantly modulated by ivermectin treatment in a clear concentration-dependence manner. In mouse hepatocyte cell line, Fig. 1A shows that *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Abcc2*, *Cyp1a1*, *Cyp1a2* and *Cyp2b10* mRNA levels are significantly increased by ivermectin treatment in a concentration-dependence manner. The most substantial changes were observed with *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Abcc2*, *Cyp1a1* and *Cyp2b10* after an ivermectin exposure at 10 μM, inducing the mRNA expression by 2.1-, 1.9-, 2.1-, 4.0 and 2.9-fold, respectively. In addition to

Table 1
Primer sequences used in quantification of the gene expression by qRT-PCR.

Targeted gene	GenBank™ accession number	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>Abcb1a</i>	NM011076	CATGACAGATAGCTTTGCAAGTGTAG	GGCAACATGGCTCTTTTATCG
<i>Abcb1b</i>	NM011075	AAGCCAGTATTCTGCCAAGCAT	CTCCAGACTGCTGTGCTGATG
<i>Abcc1</i>	NM008576	GAAGAAGGAATGTGATAAGTCAAGGAA	GGCCTTGCTGGGATCTTTGG
<i>Abcc2</i>	NM013806	AAGCAGATTGACACCAACCAGAA	GGCCGAGCAGAAGACAATCA
<i>Abcc3</i>	NM029600	TCITGCTGATACCACTCAATGGA	GCCGGAGTCCCTTGAACCTCAT
<i>Abcg2</i>	NM011920	AACACTTCTCATGACAATCGCTTTT	GCCCAATGGTCTCTGAGATTCAC
<i>Cyp1a1</i>	NM009992	GGCAGCCACCTAGATCATGC	GAATACGGTGACAGCCAGGAG
<i>Cyp1a2</i>	NM009993	CAGTGGTACAGATGGCGTTCTC	GCAGTGGCCAGTAGCAGCTC
<i>Cyp2b10</i>	NM009999	TTTCTGCCCTTCTCAACAGGAA	ATGGACGTGAAGAAAAGGAACAAC
<i>Cyp3a11</i>	NM007818	TCACACACAGTGTAGGCAGAA	GTTTACGAGTCCCATATCGGTAGAG
<i>TBP</i>	NM013684	ACTTCTGCAAGAAATGCTGAA	GCAGTGTCCGTGGCTCTCT

Please cite this article as: Albérich, M., et al., Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes *in vitro* and *in vivo* in mice. Eur J Pharmacol (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.052>

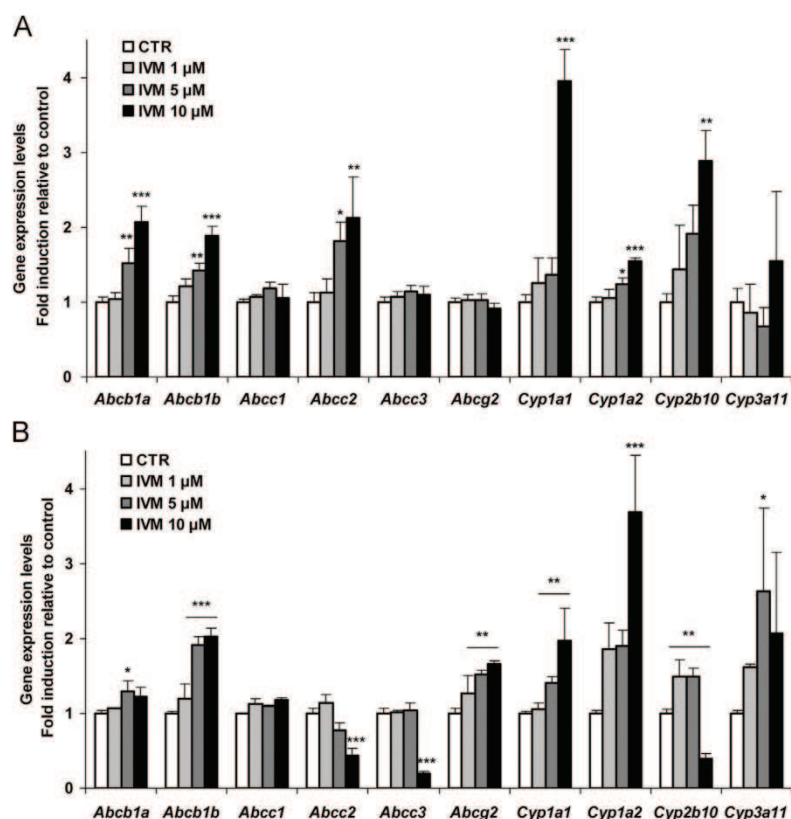


Fig. 1. Concentration-dependent effects of ivermectin on ABC transporters and cytochromes P450 mRNA levels. Mouse JWZ hepatocytes (A) or CMT93 intestinal cells (B) are either untreated (CTR) or exposed to increasing concentrations of ivermectin (IVM), ranging from 1 to 10 μ M, for 24 h. Changes in ABC efflux transporters and cytochromes P450 mRNA levels, normalized with respect to TBP mRNA levels, are determined by real-time qPCR using gene-specific primers as described in Section 2. The mRNA expression levels are expressed as -fold induction relative to control (DMSO) and are reported as the mean \pm S.D. of three to six independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control.

these up-regulations, ivermectin failed to affect *Abcc1*, *Abcc3*, *Abcg2* and *Cyp3a11* mRNA expression levels whatever the concentration studied. As far as intestinal cell line was concerned, Fig. 1B shows that ivermectin is also able to increase significantly mRNA levels of *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Abcg2*, *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, *Cyp2b10* and *Cyp3a11* in a concentration-dependence manner in CMT93 cells. In contrast to what was observed in hepatocyte cell line, 10 μ M of ivermectin led to a significant decrease in *Abcc2* and *Abcc3* gene expressions in intestinal cell line up to 40% and 20% compared with untreated control cells ($P < 0.001$), respectively.

3.2. *in vivo* modulation of detoxification genes expression in mouse liver and intestine after single or repeated ivermectin administration

Because induction of ABC efflux transporters and drug-metabolizing enzymes can fundamentally alter pharmacological and toxicological impacts of drugs or xenobiotics, it was essential to investigate the impact of ivermectin on detoxification genes expression *in vivo*. Expression of ABC efflux transporters and CYPs was determined in mice exposed orally to single or repeated ivermectin administration in comparison with vehicle treated animals. Fold induction relative to control are shown in liver (Fig. 2A) and in intestine (Fig. 2B). Fig. 2 shows that administration of a single therapeutic dose of ivermectin did not cause any significant change in mRNA levels of genes of interest neither in the liver nor in the intestine, while the administration of repeated

therapeutic doses of ivermectin resulted in significant modulations compared with untreated mice.

In liver, Fig. 2A shows that the expression level of *Cyp3a11* is significantly increased after repeated ivermectin administration (2.6-fold, $P < 0.01$). In the mean time, *Cyp2b10* tended to increase while the expression of other genes remained unchanged. In intestine, Fig. 2B shows that repeated therapeutic doses of ivermectin are able to increase considerably *Cyp1a1* mRNA level up to 6.5-fold ($P < 0.001$). In addition, repeated ivermectin administration slightly, but significantly, induced the intestinal gene expression of *Abcb1a*, *Abcc2* and *Cyp2b10* (1.6-, 1.4-, and 1.6-fold, respectively).

3.3. *in vivo* disposition of ivermectin and its main metabolite after single or repeated drug administration in mice

Knowing that PGP1 plays a key role in ivermectin biodisposition (Kiki-Mvouaka et al., 2010; Laffont et al., 2002) and that CYP1A and CYP3A subfamilies are involved in ivermectin metabolism (Zeng et al., 1998, 1997, 1996b), we investigated whether changes in gene expression observed in liver and intestinal mucosa of mice could impact on the body distribution of ivermectin. We therefore analyzed ivermectin concentration and investigated ivermectin metabolite levels in plasma, liver, intestine and brain after single or repeated ivermectin administration in mice.

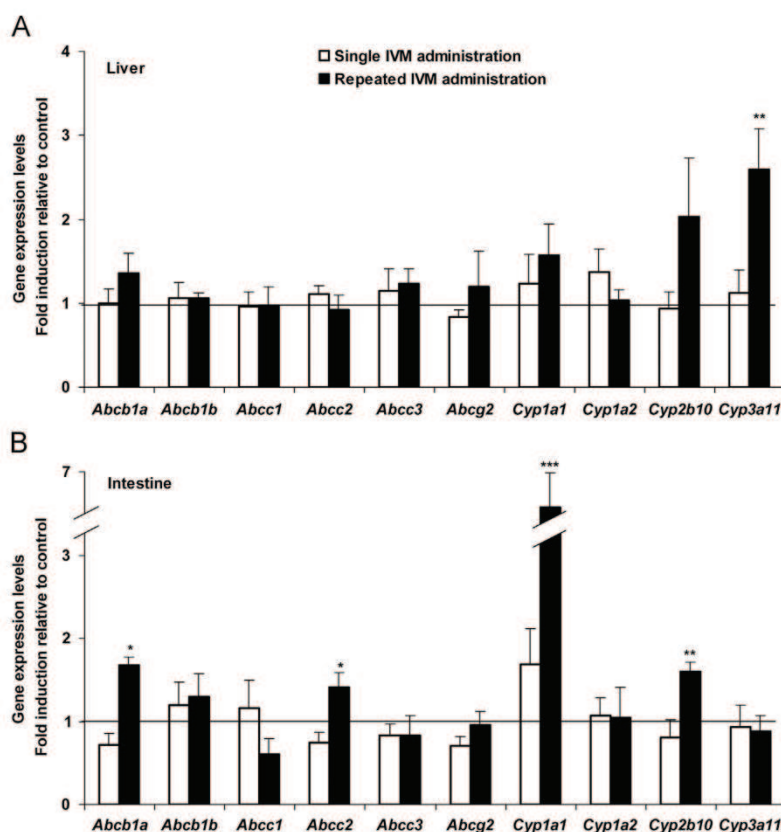


Fig. 2. Effects of ivermectin on ABC transporters and Cytochromes P450 mRNA levels in liver (A) and in small intestine (B) after single or repeated ivermectin administration in mice. Mice are given orally ivermectin (IVM) at 0.2 mg/kg or the vehicle either in single or repeated administration (two times per week during 5 weeks). 48 h after the latest administration, mice are killed and changes in ABC efflux transporters and cytochromes P450 mRNA levels, normalized with respect to TBP mRNA levels, are determined by real-time qPCR using gene-specific primers as described in Section 2. The mRNA expression levels are expressed as -fold induction relative to control (vehicle) which is set to one and are reported as the mean \pm S.D. ($n=4$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control.

Ivermectin distribution was clearly modified after repeated administration compared with a single administration. Indeed, Fig. 3 shows that administration of repeated therapeutic doses of ivermectin led to a significant decrease of drug concentration in plasma (1.7-fold, $P < 0.001$), in liver (2.4-fold, $P < 0.01$) and in intestine (2.3-fold, $P < 0.05$) compared with a single therapeutic administration. Brain ivermectin concentration was not affected by the repeated administration of ivermectin, showing that the protective role of the blood-brain barrier remained unchanged.

The decrease in ivermectin plasma and tissues concentrations in mice treated with repeated doses of the antiparasitic drug compared with mice receiving a single administration could suggest that the efflux out of the organism and/or the metabolism of the parental drug was induced. The second major peak observed on the chromatogram corresponded to an ivermectin metabolite. Although we did not proceed further to the identification of this compound, it could be 26-Hydroxymethyl H_2B_{1A} , on the basis of its retention time and in agreement with previous reports (Zeng et al., 1998, 1996a, 1997, 1996b). The peak area of ivermectin and this main metabolite as well as the metabolite percentage are listed in Table 2. As expected, peak area of ivermectin in plasma, liver and intestine was significantly lower after repeated ivermectin administration than after a single administration, in accordance with the lower drug concentration in these tissues (Fig. 3). In plasma, a significant increase of the metabolite percentage (1.7-fold, $P < 0.05$) in response to repeated therapeutic administration of ivermectin was observed. As far as liver was concerned, repeated

ivermectin administration led to a significant decrease of ivermectin metabolite amount (2.9-fold, $P < 0.01$). Consequently, the 2.3-fold decrease in ivermectin content led to a similar metabolite percentage when compared with a single ivermectin administration. In contrast, repeated ivermectin administration increased significantly the amount of ivermectin metabolite in the intestinal mucosa (4.1-fold, $P < 0.05$) in mirror of the decrease of ivermectin concentration. Consequently, the percentage of metabolite was considerably increased, in intestine, in response to repeated therapeutic doses of ivermectin (8.8-fold, $P < 0.01$).

Taken together, these results show that, in comparison with administration of a single ivermectin dose, repeated administration of therapeutic doses of ivermectin lead to a reduction in parental drug concentrations in plasma, liver and intestinal tissue and a concomitant increase of ivermectin main metabolite in the intestine.

4. Discussion

Interaction of the drug with live organisms can result in adaptation of detoxification systems, particularly those participating in the elimination and biotransformation of the pharmacological agent. Regarding ivermectin, its elimination kinetic is controlled by cytochromes and ABC efflux transporters. They are therefore important determinants of efficacy since the persistent anthelmintic activity of ivermectin is based on the presence of the

concentration of active drug in the host organism during a certain period of time.

We have recently shown that ivermectin has a significant potential to induce P-glycoprotein (PGP1, ABCB1) gene expression *in vitro* in hepatocyte cell line (Ménézet et al., 2012). In the present study, ivermectin treatment led to up-regulation of a number of important ABC efflux transporters and key drug-metabolizing enzymes in murine JWZ hepatocyte and in CMT93 intestinal cell lines. Ivermectin was able to induce the two P-glycoprotein murine isoforms, *Abcb1a* and *Abcb1b*, mRNA levels in both cell types. Ivermectin also up-regulated gene expression of two important efflux transporters, namely *ABCC2* and *ABCG2*, in a concentration- and tissue-specific-dependent manner. Indeed, *Abcc2* expression was induced specifically in hepatocyte cell line whereas *Abcg2* expression was substantially increased in the intestinal cell line. These two efflux ABC transporters are expressed concomitantly with the PGP1 at the apical membrane of various cells, *ABCC2* being predominantly expressed in the canalicular membrane of hepatocytes and involved in the excretion of various compounds from hepatocytes into bile, and *ABCG2* being expressed on enterocytes and known to play an important role in limiting intestinal drug absorption. In this study, ivermectin was also found to induce gene expression of four of the major drug-metabolizing enzymes, namely *Cyp1a1*, *Cyp1a2* and *Cyp2b10* in a concentration-dependent manner in both hepatocyte and

intestinal cell lines, while *Cyp3a11* expression was only increased in intestinal cell line.

Enterocytes and hepatocytes cell lines are generally used to study entry and detoxification of drugs and important correlation exists between regulation of ABC transporters or CYP mRNA levels and increase in protein expression and activity after exposure to a variety of xenobiotics in many cell lines (Cermanova et al., 2010; Chin et al., 1990; Pajic et al., 2009; Schrenk et al., 2001; Zanger and Schwab, 2013). In this respect, our *in vitro* data are important because they suggest that ivermectin treatment could lead to an increased intestinal and biliary excretion for ABC transporters and cytochromes substrates.

Since it is difficult to draw a parallel between the concentrations of drugs used to expose cells and those to which tissues are exposed *in vivo*, we then evaluated the effect of ivermectin after single or repeated oral administration on detoxification genes expression and on corresponding metabolism activities, *in vivo*, in mice. Interestingly, a single administration of ivermectin did not change the expression of any of the genes explored here. Nevertheless after repeated administration, ivermectin was able to significantly induce *Abcb1a*, *Abcc2*, *Cyp1a1* and *Cyp2b10* in the intestine, and to up-regulate *Cyp3a11* in liver. For some genes, such as *Abcb1a*, *Cyp1a1* and *Cyp2b10* in intestine, *in vivo* data were in agreement with those obtained *in vitro*, although increase in their expression were greater in CMT93 cells compared with intestinal tissue. Nevertheless, discrepancies in regulation of gene expression between *in vitro* and *in vivo* results were observed, which could be due to the amount of drug to which cells are exposed *in vitro* in comparison with tissues *in vivo*. Indeed, ivermectin concentrations leading to induction of gene expression *in vitro* in this study ranged from 5 to 10 μM . Knowing that pharmacokinetic studies performed in rodent have reported an ivermectin plasma maximal concentration of 0.06 μM (Kiki-Mvouaka et al. 2010) and 8-fold higher gut mucosal concentration compared with plasma concentration (Ballent et al. 2006), we can assume that intestinal cell line was exposed to higher concentration than intestinal mucosa in mice. In addition, due to the particular biodisposition of ivermectin in mice after oral administration, intestinal mucosal tissue should be exposed to a higher ivermectin concentration compared with liver. Altogether, this may, at least partly, explain why the effect of ivermectin on some detoxification genes expression is more pronounced in intestine than in liver.

Since ivermectin is a well-known PGP1 and CYP1A1 substrate, which both participate to the elimination of the drug out of the cells or the organism, we evaluated the impact of the observed gene regulations on plasma and tissue distribution of ivermectin in mice after the last drug administration. An important finding of this study is that animals receiving a repeated treatment with ivermectin have significantly lower levels of ivermectin in plasma, liver and intestine compared with the single-exposed mice, 48 h after drug administration. These results are consistent with higher

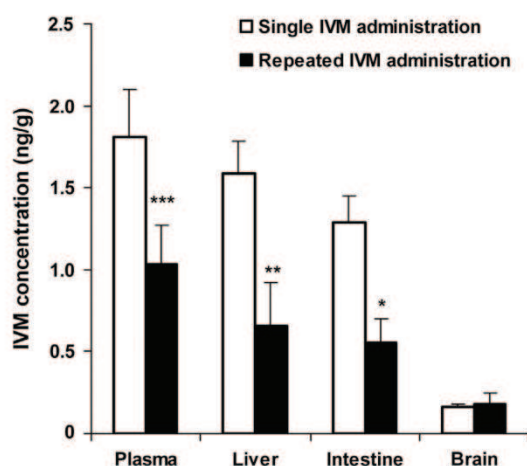


Fig. 3. Influence of single or repeated ivermectin administration on drug concentration in mice plasma and tissues. Mice are given orally ivermectin (IVM) at 0.2 mg/kg or the vehicle either in single or repeated administration (two times per week during 5 weeks). Blood and tissues are collected 48 h after the latest oral administration. Drug concentration is measured in plasma and tissues by HPLC, as described in Section 2. All measurements are expressed as the mean \pm S.D. ($n=4$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. single IVM administration.

Table 2

Influence of single or repeated ivermectin administration on metabolite concentration in mice plasma and tissues.

	Plasma		Liver		Intestine	
	Single	Repeated	Single	Repeated	Single	Repeated
IVM peak area (mV/mn/g)	4.67 \pm 0.76	2.75 \pm 0.63 ^c	4.06 \pm 1.21	1.82 \pm 0.74 ^a	3.57 \pm 1.35	1.56 \pm 0.85 ^a
Metabolite peak area (mV/mn/g)	1.10 \pm 0.14	1.14 \pm 0.30	9.48 \pm 2.24	3.27 \pm 1.09 ^b	0.82 \pm 0.19	3.01 \pm 1.51 ^a
Metabolite (%)	24.1 \pm 3.9	42.0 \pm 10.6 ^a	242.3 \pm 54.6	213.6 \pm 52.0	23.8 \pm 3.3	203.8 \pm 81.4 ^b

Metabolite percentage calculated from the total amount of the parent drug = (Peak area_{Metabolite} / Peak area_{IVM}) \times 100.

^a $P < 0.05$.

^b $P < 0.01$.

^c $P < 0.001$ vs. single administration.

Please cite this article as: Albérich, M., et al., Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes *in vitro* and *in vivo* in mice. Eur J Pharmacol (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.052>

activities of PGP1 and CYP1A1 and with the increase of the gene expression observed in our study after repeated administration of the drug. Indeed, given that intestinal secretion is the most important mechanism of ivermectin elimination (Laffont et al., 2002), the up-regulation of *Abcb1a*, encoding the rodent PGP1 isoform expressed at high level in intestine, may increase the PGP1-mediated efflux of ivermectin out of the organism and contribute to lower tissue concentration. Consistently with our observations, previous data demonstrated a correlation between the modulation of PGP1 activity and ivermectin kinetics *in vivo* (Ballent et al., 2007; Kiki-Mvouaka et al., 2010; Lifschitz et al., 2010; Molento et al., 2004). In addition, our data show that repeated oral administration of ivermectin led to an increase of the main metabolite percentage relative to parental drug in plasma and intestine. Given that, in rodent, one of the two main ivermectin metabolites is generated by CYP1A1 (Zeng et al., 1996b), such data are in accordance with the marked up-regulation of *Cyp1a1* gene expression in intestine and support the contribution of the gut metabolizing enzymes in lowering the bioavailability of orally administered drugs (Zhang et al., 2009).

Given that significant levels of ivermectin-derived metabolites are found in the feces (Chiu et al., 1986) and that the intestinal epithelium is able to excrete ivermectin-derived metabolites in rats (Laffont et al., 2002), it cannot be excluded that the main ivermectin metabolite found in our study can be transported *via* PGP1-dependent mechanisms. However, the higher accumulation of the metabolite relative to parental drug in plasma and intestine observed after ivermectin repeated administration, suggests that it is excreted at a lower rate than ivermectin. Nevertheless, the metabolite percentage remained unchanged in the liver after ivermectin repeated treatments, consistently with the unchanged expression of hepatic *Cyp1a1*. In agreement with these observations, induction of several cytochromes P450 isoenzymes activities, including CYP1A, CYP2B and CYP3A subfamilies, has been previously reported in rat and mouflons after repeated ivermectin treatment (Skalova et al., 2000; Skalova et al., 2001). Moreover, pre-treatment with CYP and PGP1 inducers, accounted for lower ivermectin availability in the bloodstream and at the gastrointestinal tissues in host (Areskog et al., 2012; Ballent et al., 2010), associated with impaired efficacy and shorter persistence of the antiparasitic activity (Areskog et al., 2012). The reduced anthelmintic activity of polar ivermectin derivatives (McKellar and Benchaoui, 1996) contribute to lower ivermectin efficacy.

The molecular mechanisms by which ivermectin modulates the expression of genes encoding enzymes and cytochromes involved in its own metabolism remain to be determined. Recent reports show that ivermectin is a partial agonist of the farnesoid X receptor (FXR; NR1H4) (Jin et al., 2013) but do not display PXR (pregnane X receptor), CAR (constitutive androstane receptor) nor AhR (aryl-hydrocarbon receptor) ligand activities (Ménez et al., 2012). Further research should therefore address the possible link between the activation of FXR and any other putative regulation factors, and the effects herein presented after repeated administration.

Considering the well-established correlation between macrocyclic lactones plasma profiles in the host organism and those achieved at the tissues of parasite location (Lifschitz et al., 1999b, 2000), and the exposure–response relationship existing for ivermectin in many host species (Hennessy and Alvinerie, 2002), our data suggest that repeated administration of ivermectin may increase the risk of generating subtherapeutic drug concentrations in host tissues where parasites are located, which is one factor involved in the development of resistance (Van Zeveren et al., 2007). These findings can be regarded as a warning that repeated ivermectin exposure is able to induce detoxification systems in mammals and may be an important consideration in the assessment of drug–drug interaction and toxicity susceptibility associated with other ABC transporters and CYP450 substrates.

Moreover, several successive ivermectin treatments have been used in human medicine in a case of *Strongyloides* hyperinfection syndrome (van Westerloo et al., 2013) and are recommended for an optimized treatment of human lice (Chosidow and Giraudeau, 2012). Together with our data, this emphasizes that treatment protocols should be closely guided by serum levels to anticipate subtherapeutic concentrations, in a context of increasingly wide use of the anthelmintic ivermectin.

5. Conclusion

In summary, our study demonstrates for the first time that even though a single therapeutic dose of ivermectin administered orally in mice has no significant effect on any metabolizing enzymes or transporters explored here, when administered repeatedly, ivermectin causes induction of those detoxification genes leading to unexpected low drug concentrations in plasma and tissues that could alter the drug efficacy. This study shows that caution has to be taken regarding modulation of detoxification systems in case of repeated exposure to the anthelmintic ivermectin.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Edwin Fouche for valuable help in conducting *in vivo* experiments and Cecile Sotto for contributions in HPLC analysis. We also thank Fabrice Pierre for providing CMT93 cells and Laila Mselli-Lakhal for providing JWZ cells and for helpful advices and discussions. This work has been partly supported by the ANR (Grant no. 2011-EMID-003-02) *via* EMIDA ERA-NET European consortium program.

References

- Alvinerie, M., Escudero, E., Sutra, J.F., Eckhoutte, C., Galtier, P., 1998. The pharmacokinetics of moxidectin after oral and subcutaneous administration to sheep. *Vet. Res.* 29, 113–118.
- Areskog, M., von Samson-Himmelstjerna, G., Alvinerie, M., Sutra, J.F., Hoglund, J., 2012. Dexamethasone treatment interferes with the pharmacokinetics of ivermectin in young cattle. *Vet. Parasitol.* 190, 482–488.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Mate, L., Lanusse, C., 2010. Pretreatment with the inducers rifampicin and phenobarbital alters ivermectin gastrointestinal disposition. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 33, 252–259.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C., 2006. Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: *in vitro* and *in vivo* assessments. *Drug. Metab. Dispos.* 34, 457–463.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C., 2007. Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 242–248.
- Carriere, V., Chambaz, J., Rousset, M., 2001. Intestinal responses to xenobiotics. *Toxicol. in vitro* 15, 373–378.
- Cermanova, J., Fuksa, L., Brackova, E., Hroch, M., Kucera, O., Kolouchova, G., Hirsova, P., Malakova, J., Staud, F., Martinkova, J., Cervinkova, Z., Micuda, S., 2010. Up-regulation of renal Mdr1 and Mrp2 transporters during amiodarone pretreatment in rats. *Pharmacol. Res.* 61, 129–135.
- Chin, K.V., Chauhan, S.S., Pastan, I., Gottesman, M.M., 1990. Regulation of *mdr* RNA levels in response to cytotoxic drugs in rodent cells. *Cell Growth Differ.* 1, 361–365.
- Chiu, S.H., Sestokas, E., Taub, R., Buhs, R.P., Green, M., Sestokas, R., Vandenheuvel, W.J., Arison, B.H., Jacob, T.A., 1986. Metabolic disposition of ivermectin in tissues of cattle, sheep, and rats. *Drug. Metab. Dispos.* 14, 590–600.
- Chosidow, O., Giraudeau, B., 2012. Topical ivermectin—a step toward making head lice dead lice? *N. Engl. J. Med.* 367, 1750–1752.
- Donato, M.T., Lahoz, A., Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., 2008. Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies. *Curr. Drug. Metab.* 9, 1–11.
- Eveillard, A., Mselli-Lakhal, L., Mogha, A., Lasserre, F., Polizzi, A., Pascussi, J.M., Guillou, H., Martin, P.G., Pineau, T., 2009. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1735–1746.
- Giacomini, K.M., Huang, S.M., Tweedie, D.J., Benet, L.Z., Brouwer, K.L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K.M., Hoffmaster, K.A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R.B., Lee, C.A., Niemi, M., Polli, J.W., Sugiyama, Y., Swaan, P.W., Ware, J.A., Wright, S.H., Yee, S.W., Zamek-Gliszczynski, M.J., Zhang, L., 2010.

- Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 9, 215–236.
- Hennessy, D.R., Alvinerie, M., 2002. Pharmacokinetics of the macrocyclic lactones: conventional wisdom and new paradigms. In: Vercruysse, J., Rew, R.S. (Eds.), *Macrocyclic Lactones and Antiparasitic Therapy*. CAB International, New York, pp. 97–123.
- Jani, M., Makai, I., Kis, E., Szabo, P., Nagy, T., Krajcsi, P., Lespine, A., 2011. Ivermectin interacts with human ABCG2. *J. Pharm. Sci.* 100, 94–97.
- Jin, L., Feng, X., Rong, H., Pan, Z., Inaba, Y., Qiu, L., Zheng, W., Lin, S., Wang, R., Wang, Z., Wang, S., Liu, H., Li, S., Xie, W., Li, Y., 2013. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nat. Commun.* 4, 1937.
- Kiki-Mvouaka, S., Menez, C., Borin, C., Lyazrhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J., Collet, X., Alvinerie, M., Lespine, A., 2010. Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: A comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug. Metab. Dispos.* 38, 573–580.
- Laffont, C.M., Toutain, P.L., Alvinerie, M., Bousquet-Melou, A., 2002. Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug. Metab. Dispos.* 30, 626–630.
- Lespine, A., Alvinerie, M., Vercruysse, J., Prichard, R.K., Geldhof, P., 2008. ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends. Parasitol.* 24, 293–298.
- Lespine, A., Dupuy, J., Orłowski, S., Nagy, T., Glavinas, H., Krajcsi, P., Alvinerie, M., 2006. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem. Biol. Interact.* 159, 169–179.
- Lespine, A., Menez, C., Bourguinat, C., Prichard, R., 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.* 2, 58–75.
- Lifschitz, A., Suarez, V.H., Sallovitz, J., Cristel, S.L., Imperiale, F., Ahoussou, S., Schiavi, C., Lanusse, C., 2010. Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. *Exp. Parasitol.* 125, 172–178.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Imperiale, F., Sutra, J.F., Galtier, P., Lanusse, C., Alvinerie, M., 1999a. Moxidectin in cattle: correlation between plasma and target tissues disposition. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 22, 266–273.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Pis, A., Imperiale, F., Sanchez, S., Alvarez, L., Kujaneck, R., Lanusse, C., 1999b. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Vet. Parasitol.* 86, 203–215.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M., Lanusse, C., 2000. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. *Vet. Parasitol.* 87, 327–338.
- Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Lanusse, C., Lifschitz, A., 2012. Measurement of ivermectin concentrations in target worms and host gastrointestinal tissues: influence of the route of administration on the activity against resistant *Haemonchus contortus* in lambs. *Exp. Parasitol.* 131, 304–309.
- McKellar, Q.A., Benchaoui, H.A., 1996. Avermectins and milbemycins. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 19, 331–351.
- Ménez, C., Mselli-Lakhal, L., Foucaud-Vignault, M., Balaguer, P., Alvinerie, M., Lespine, A., 2012. Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. *Biochem. Pharmacol.* 83, 269–278.
- Molento, M.B., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Lanusse, C., Prichard, R., 2004. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitol. Res.* 92, 121–127.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Pajic, M., Iyer, J.K., Kersbergen, A., van der Burg, E., Nygren, A.O., Jonkers, J., Borst, P., Rottenberg, S., 2009. Moderate increase in Mdr1a/1b expression causes *in vivo* resistance to doxorubicin in a mouse model for hereditary breast cancer. *Cancer Res.* 69, 6396–6404.
- Pouliot, J.F., L'Heureux, F., Liu, Z., Prichard, R.K., Georges, E., 1997. Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem. Pharmacol.* 53, 17–25.
- Schinkel, A.H., Jonker, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3–29.
- Schrenk, D., Baus, P.R., Ermel, N., Klein, C., Vorderstemann, B., Kauffmann, H.M., 2001. Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol. Lett.* 120, 51–57.
- Sinz, M., Wallace, G., Sahi, J., 2008. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: preclinical and clinical. *Aaps J.* 10, 391–400.
- Skalova, L., Szotakova, B., Machala, M., Neca, J., Lamka, J., Duchacek, L., Kvasnickova, E., 2000. Effect of ivermectin on induction of cytochromes P450 in male rats. *Chem. Pap.* 54, 249–253.
- Skalova, L., Szotakova, B., Machala, M., Neca, J., Soucek, P., Havlasova, J., Wsol, V., Kridova, L., Kvasnickova, E., Lamka, J., 2001. Effect of ivermectin on activities of cytochrome P450 isoenzymes in mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer (*Dama dama*). *Chem. Biol. Interact.* 137, 155–167.
- Tien, E.S., Gray, J.P., Peters, J.M., Vanden Heuvel, J.P., 2003. Comprehensive gene expression analysis of peroxisome proliferator-treated immortalized hepatocytes: identification of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-dependent growth regulatory genes. *Cancer Res.* 63, 5767–5780.
- van Westerloo, D.J., Landman, G.W., Prichard, R., Lespine, A., Visser, L.G., 2013. Persistent coma in *Strongyloides* hyperinfection syndrome associated with persistently increased ivermectin levels. *Clin. Infect. Dis.* 58, 143–144.
- Van Zeveren, A.M., Casaert, S., Alvinerie, M., Geldhof, P., Claerebout, E., Vercruysse, J., 2007. Experimental selection for ivermectin resistance in *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Vet. Parasitol.* 150, 104–110.
- Zanger, U.M., Schwab, M., 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* 138, 103–141.
- Zeng, Z., Andrew, N.W., Arison, B.H., Luffer-Atlas, D., Wang, R.W., 1998. Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. *Xenobiotica* 28, 313–321.
- Zeng, Z., Andrew, N.W., Green-Erwin, M.L., Halley, B.A., 1996a. Fate of 4'-epiacyetyl amino-4'-deoxyivermectin B1 in rats. *Drug. Metab. Dispos.* 24, 572–578.
- Zeng, Z., Andrew, N.W., Halley, B.A., 1997. Identification of cytochrome P4503A as the major enzyme sub-family responsible for the metabolism of 22,23-dihydro-13-O-[(2-methoxyethoxy)methyl]-ivermectin B1 aglycone by rat liver microsomes. *Xenobiotica* 27, 985–994.
- Zeng, Z., Andrew, N.W., Woda, J.M., Halley, B.A., Crouch, L.S., Wang, R.W., 1996b. Role of cytochrome P450 isoforms in the metabolism of abamectin and ivermectin in rats. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3374–3378.
- Zhang, Q.Y., Fang, C., Zhang, J., Dunbar, D., Kaminsky, L., Ding, X., 2009. An intestinal epithelium-specific cytochrome P450 (P450) reductase-knockout mouse model: direct evidence for a role of intestinal p450s in first-pass clearance of oral nifedipine. *Drug. Metab. Dispos.* 37, 651–657.

CHAPITRE 2

**ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION
TRANSCRIPTIONNELS IMPLIQUES DANS L'INDUCTION DE
L'EXPRESSION D'*ABCB1A* ET *ABCB1B* EN REPOSE A
L'IVERMECTINE**

Transcriptional regulation mechanisms involved in ivermectin-dependent over-expression of *Abcb1a* and *Abcb1b*

Après avoir étudié l'impact de l'ivermectine sur l'expression des gènes codant pour les enzymes des systèmes de détoxification, nous avons évalué les mécanismes transcriptionnels responsables de telles inductions au sein de la lignée hépatocytaire murine.

Dans cette étude, nous avons cherché le facteur de transcription à l'origine de l'induction de l'expression d'*Abcb1a* et *Abcb1b*, en étudiant l'expression des gènes cibles connus pour les différentes voies de régulation en réponse à l'ivermectine.

Cette étude suggère que l'induction de l'expression d'*Abcb1a* et d'*Abcb1b* est partiellement dépendante des voies de régulation NF- κ B et NRF2. Cette étude a aussi montré que l'ivermectine induit fortement l'expression du gène codant pour la cytokine inflammatoire Il6 suggérant la possible hépato-toxicité de l'ivermectine.

Transcriptional regulation mechanisms involved in ivermectin-dependent over-expression of *Abcb1a* and *Abcb1b*

1) Introduction

The macrocyclic lactone (ML) ivermectin remains the leading anthelmintic drug used to control endo- and ecto- parasites in veterinary and human medicine (Fox, 2006). However, intensive use of this broad-spectrum antiparasitic drug has led to the worldwide development of high level of resistance in parasite (Kaplan and Vidyashankar, 2012). Resistance threatens the sustainability of the ongoing global effort to reduce such parasites responsible for high morbidity in animals (Fitzpatrick, 2013) and humans (Hashmi et al., 2001; Lustigman et al., 2012). Over the past 40 years, there have been very few new classes of anthelmintics developed having the breadth of spectrum as MLs, thus relevant current strategies reside in optimizing MLs antiparasitic efficacy (Lespine A., 2012). The main mechanisms responsible for ivermectin resistance, as described in the literature, is the over-expression of some ABC transporters leading to an increase of the drug efflux from the target cells (Ardelli, 2013; Lespine A., 2012).

ABC (ATP-binding cassette) proteins constitute a large family that includes, in all kingdoms of life, a number of active membrane transporters handling a variety of substrate types (ions, peptides, glucides, hormones, lipids...), by using the energy produced by ATP hydrolysis. In mammals, few ABC transporters present the remarkable property of actively pumping a huge diversity of xenobiotics out of cells. Since they are expressed in the main tissue barriers of the organism, their activity lead to its protection against exogenous, potentially toxic compounds by decreasing their intracellular concentration. These detoxification transporters include ABCB1, which is also responsible for the multidrug resistance phenotype of tumour cells against various anticancer chemotherapy agents.

In mammals, the expression of ABC efflux transporters is mainly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels. At transcriptional level, many members of the nuclear receptor family such as estrogen receptor ER (Arias et al., 2014), glucocorticoid receptor GR (Narang et al., 2008), liver X receptor LXR (ElAli and Hermann, 2012), farnesoid receptor FXR (Jiang et al., 2013), vitamin D receptor VDR (Chow et al., 2011), pregnane X receptor PXR (Harmsen et al., 2013; Lemmen et al., 2013a) and thyroid hormone receptor TR (Kurose et al., 2008) have been described to be implicated in *Abcb1* expression regulation. Moreover, other transcription factors such as Ahr (Jigorel et al., 2006), NRF2 (Aleksunes and Klaassen, 2012) and NF- κ B (Bentires-Alj et al., 2003) have been implicated in *Abcb1* expression. At

post-transcriptional level, *Abcb1* expression is regulated by stabilization of its mRNA (Rodrigues et al., 2009) or by histone deacetylases inhibition (Sike et al., 2014).

Ivermectin is well described to be transported by ABCB1, and it was recently shown to induce *Abcb1* expression both *in vitro* and *in vivo* in mouse (Albérich et al., 2014). In addition, this ivermectin-dependent up-regulation of *Abcb1* was shown to occur, *in vitro*, at least partly, through mRNA stabilization. Furthermore, ivermectin did not display CAR, PXR and Ahr activities (Ménez et al., 2012a). Recently, ivermectin has been shown to be a partial agonist of FXR, displaying properties in modulating coregulator recruitment (Jin et al., 2013). Moreover, avermectin, a macrocyclic lactone structurally close to ivermectin, was described to exert anti-inflammatory effects (Hattinger et al., 2009) and to induce ABCB1 protein expression (Luo et al., 2013b) through an activation of the nuclear transcription factor NF- κ B signalling pathway. With such recent results, one can raise the question whether ivermectin may also regulate *Abcb1* by one of these transcription factor pathways.

In this context, this study aimed at investigating the transcriptional mechanisms responsible for *Abcb1* up-regulation in response to ivermectin.

2) Materials and Methods

2.1 Materials

Dimethylsulfoxide (DMSO) and ivermectin were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), glutamine, penicillin-streptomycin solution (10,000 units/ml penicillin and 10,000 µg/ml of streptomycin), trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA) and Trizol Reagent were obtained from Invitrogen - Life Technologies (Cergy Pontoise, France). Tissue culture plastic flasks and culture plates were supplied by Sarstedt (Orsay, France). BAY-11-7082 and all other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

2.2 Cell cultures and treatments

JWZ murine hepatic cells were kindly provided by Dr. L. Mselli-Lakhal (Toxalim, Toulouse, France) and were previously described (Ménez et al., 2012b). JWZ cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. JWZ cells were kept in 5% CO₂ and 95% humidity at 37°C. Every 3-4 days, cells were trypsinized and seeded at 5x10⁵ cells per 6-well cluster trays for induction studies. The cells were grown at more than 80% confluence, and exposed to ivermectin at 10 µM, in the presence or absence of the NF-κB inhibitor BAY-11-7082 (BAY), or to the vehicle solvent alone as control condition for 24 h. Under conditions using BAY, it was added at 2.5 µM in the culture medium 2 hours prior ivermectin treatment. Ivermectin and BAY were dissolved in DMSO at a final concentration of 0.1% (v/v). For the various experimental conditions used, cell viability was checked using the MTT colorimetric assay (Mosmann, 1983), and protein amount was determined by using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France), as previously described (Ménez et al., 2012b). Cells were then harvested, mRNA was isolated, and modulation of detoxification systems mRNA expression was quantified by real-time qRT-PCR.

2.3 Total RNA isolation and RT-PCR analysis

Isolation of RNA and cDNA synthesis

Total RNA from cultured cells was extracted using Trizol Reagent according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). RNA purity was checked by measurement of the A260/280 nm ratio, which was routinely in the range of 1.8-

2.0. cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems – Life Technologies, Courtaboeuf, France).

Quantification of mRNA expression by RT-qPCR

RT-qPCR was performed using an ABI Prism 7300 Sequence Detection System instrument and software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Gene-specific primers for SYBR Green assays are described in Table 1. All primers were designed using Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems) and synthesized by Invitrogen (Cergy Pontoise, France). All primers were entered into the NCBI Blast program to ensure specificity. Results were expressed using the comparative Ct method as described in User Bulletin 2 (Applied Biosystem). Briefly, the ΔC_t values were calculated in every sample for each gene of interest as following: $C_{t \text{ gene of interest}} - C_{t \text{ reference gene}}$, with TATA-box binding protein (TBP) as the reference gene. The fold change in the level of target mRNA between treated and untreated samples was then expressed as $2^{-\Delta C_t}$ with $\Delta C_t \pm S.D$ where S.D. is the standard deviation of the mean of the ΔC_t value. A dissociation curve allowed us to verify the specificity of the amplification.

2.4 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tuckey post-test to compare the effect of ivermectin over control, while individual comparisons between pairs of data were performed using the Mann-Whitney test (GraphPad Instat, San Diego, CA, USA). Data are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). Statistical significance was accepted as $P < 0.05$.

3) Results

3.1 Effects of ivermectin on *Abcb1a* and *Abcb1b* gene expression

We first analyzed the effect of ivermectin on the expression of the two genes encoding Abcb1 in mouse, *Abcb1a* and *Abcb1b*. Expressions of these two genes were determined by RT-qPCR in the cultured mouse hepatocytes JWZ exposed to 10 μ M of ivermectin for 24 hours. Figure 1 shows that *Abcb1a* and *Abcb1b* were significantly increased by ivermectin treatment.

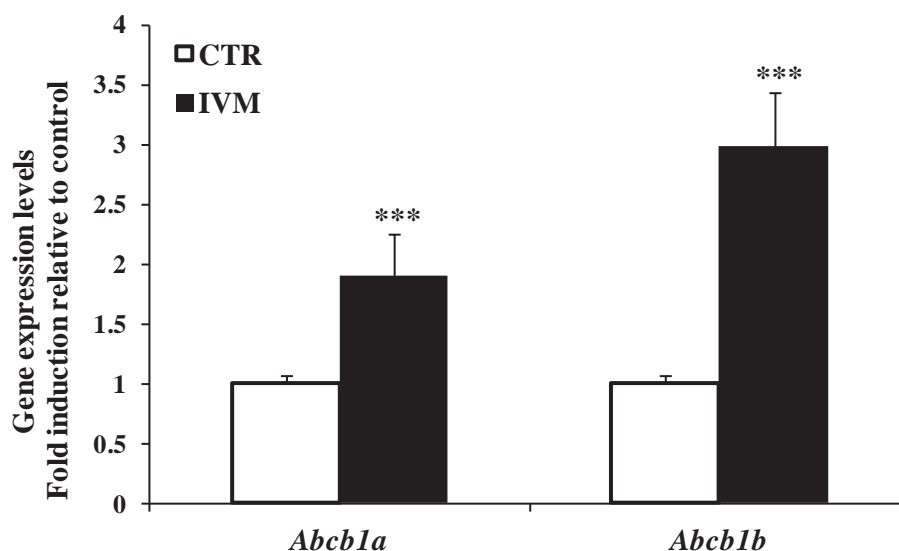


Figure 1. Effect of ivermectin on *Abcb1a* and *Abcb1b* mRNA levels. JWZ hepatocytes were either untreated or exposed to 10 μ M of ivermectin (IVM) for 24 hours. Changes in *Abcb1a* and *Abcb1b* mRNA levels, normalized with respect to TBP mRNA levels, were determined by real-time qPCR using gene-specific primers as described in Material and Methods. The mRNA expression levels were expressed as –fold induction relative to control (DMSO). Data are mean \pm S.D. from 4 independent experiments, ***P < 0.001 versus control.

The most substantial change was observed with *Abcb1b* (3.0- fold, P < 0.001). In addition, ivermectin was also shown to induce, less strongly, *Abcb1a* up to 1.9-fold (P < 0.001).

3.2 Effects of ivermectin on the expression of NF- κ B, NRF2, LXR and FXR target genes

Because *Abcb1a* and *Abcb1b* are widely described to be regulated at the transcriptional level by various transcription factors such as NF- κ B, NRF2, LXR and FXR, we investigated whether such transcription factors were potentially implicated in ivermectin-induced up-regulation of *Abcb1a* and *Abcb1b* mRNA expression. In order to examine the potential regulatory role of these transcription factors, we first investigated their expression profiles and that of their known main target genes, in response to ivermectin. The effect of ivermectin

toward NF- κ B and its target genes *Abcc6*, *Il1b*, *Inos*, *Il6* (A), NRF2 and its target genes *Ho1*, *Nqo1* (B), LXR target genes *Fasn*, *Scd1* (C), and FXR and its target genes *Abcb4* and *Shp* is shown Figure 2.

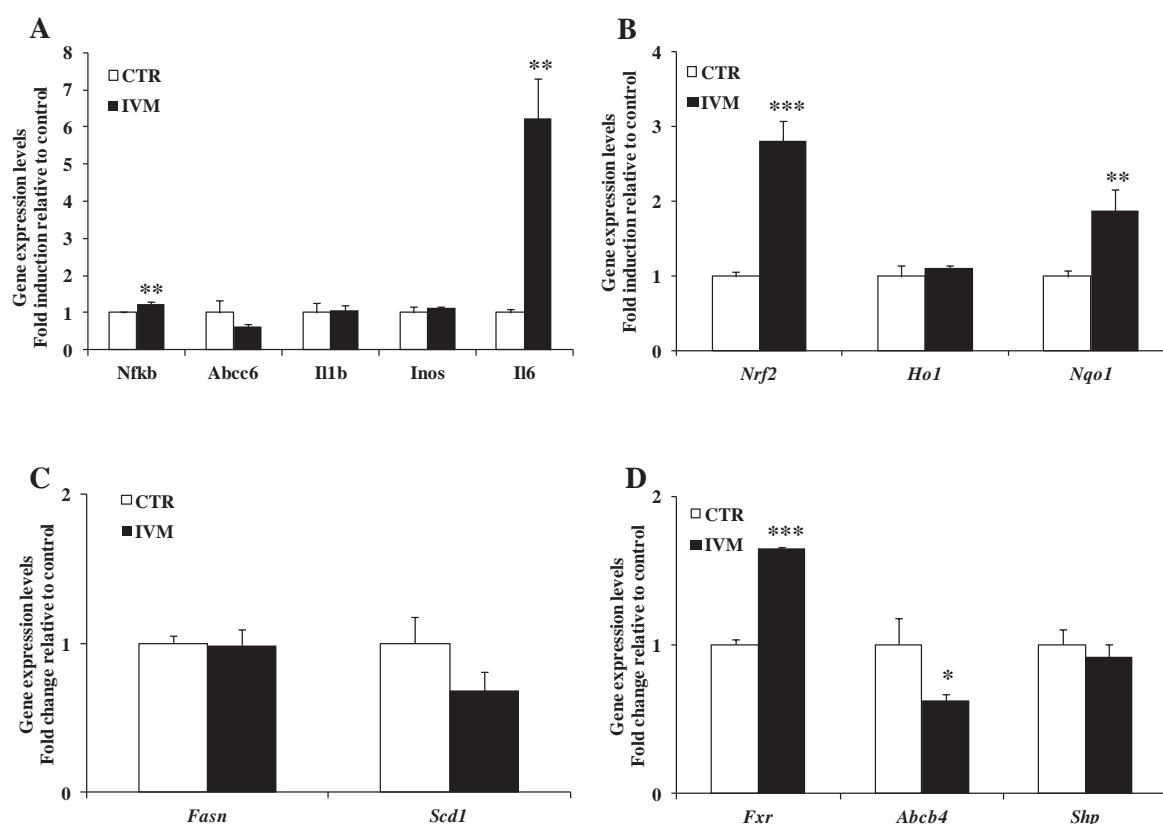


Figure 2. Effect of ivermectin on mRNA levels of different transcriptional factor pathways. NF- κ B and its target genes (A), NRF2 and its target genes (B), target genes of LXR pathway (C) and FXR and its target genes (D). JWZ hepatocytes were either untreated or exposed to 10 μ M ivermectin (IVM) for 24 hours. Changes in mRNA levels, normalized with respect to TBP mRNA levels, were determined by real-time qPCR using gene-specific primers as described in Material and Methods. The mRNA expression levels were expressed as –fold induction relative to control (DMSO). Data are mean \pm S.D. from 3 independent experiments, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 versus control.

The ivermectin-induced expression modulation was different from one gene to another for all the four transcriptional pathways studied. The expression level of gene encoding transcription factor, NF- κ B, NRF2 and FXR, was significantly increased after ivermectin treatment (1.2-, 1.6-, 1.7-fold, respectively). Among the various target genes studied, only three were significantly modulated by ivermectin treatment. Figure 2A shows that ivermectin exposure was able to increase considerably *Il6* mRNA level up to 6.2-fold (P < 0.01). In addition, the NRF2 target gene *Nqo1* (Figure 2B) was moderately induced (1.9-fold, P < 0.01). In contrast,

ivermectin led to a significant decrease in *Abcb4* gene expression (*P < 0.05). In addition, ivermectin failed to affect *Abcc6*, *Il1b*, *Inos*, *Hol*, *Fasn*, *Scd1* and *Shp* mRNA expression.

3.3 Effect of the NF- κ B inhibitor BAY on the ivermectin-induced gene expression of the NF- κ B target genes, *IL6* and *Inos* and *Abcb1a*, *Abcb1b*.

Because the most marked induction, in response to ivermectin exposure, was observed on the NF- κ B target gene *Il6*, we hypothesize that the effect on *Abcb1a* and *Abcb1b* gene expression could be mainly dependent of NF- κ B. Thus, we used the specific NF- κ B inhibitor, BAY, to address the involvement of NF- κ B in *Abcb1a* and *Abcb1b* up-regulation in response to ivermectin. BAY is described as an anti-NF- κ B reagent acting by irreversibly inhibiting I- κ B alpha phosphorylation, thus leading to suppression of nuclear translocation and transcription activity of NF- κ B (Pierce et al., 1997). We first verified whether NF- κ B pathway could be activated in our *in vitro* model of cultured hepatocytes cell line. JWZ were treated with TNF-alpha (TNF) which is a known NF- κ B activator. As in Figure 2A, we used the typical target genes of NF- κ B, *Il6* and *Inos*, as positive indicators for NF- κ B activation (Figure 3A).

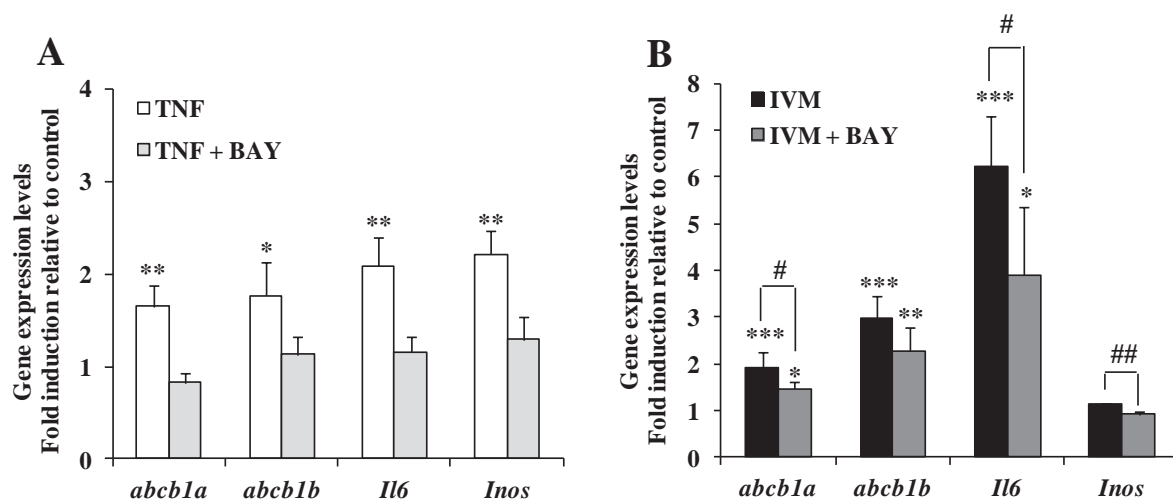


Figure 3. Influence of the NF- κ B inhibitor BAY on TNF-induced modulation (A) or IVM-induced modulation (B) of *Abcb1a* and *Abcb1b* and two NF- κ B targets, *IL6* and *iNOS* gene expression. JWZ hepatocytes were either exposed, during 24 hours, to 10 ng/ml TNF-alpha (TNF), or to 10 μ M ivermectin (IVM), in the presence or absence of 2.5 μ M BAY added 2 hours before the inducing treatment. Changes in mRNA levels, normalized with respect to TBP mRNA levels, were determined by real-time qPCR using gene-specific primers as described in Material and Methods. The mRNA expression levels were expressed as –fold induction relative to control (DMSO). Data are mean \pm S.D. from 3 independent experiments, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 versus control. #P < 0.05; ##P < 0.01 versus IVM.

When the NF- κ B pathway activator, TNF-alpha was used, a clear two-fold induction of the two NF- κ B target genes, *Il6* and *Inos* was observed, which validates our *in vitro* model. When the inhibitor BAY was used, the two-fold TNF-induced activation of the NF- κ B target genes was totally abolished. In addition, *Abcb1a* and *Abcb1b* mRNA levels were significantly increased by TNF-alpha treatment, in the same range than the reference target genes, by 1.6- and 1.8-fold, respectively. The BAY treatment suppressed totally this TNF-induced activation of *Abcb1a* and *Abcb1b*.

When considering the ivermectin-induced gene expression activation, BAY treatment resulted in a partial but significant decrease in *Abcb1a* and *Il6* gene expression by 24 % and 37 % compared with ivermectin-treated cells, respectively. In contrast, BAY treatment failed to significantly alter ivermectin-induced expression of *Abcb1b*. Finally, the BAY treatment significantly decreased *Inos* expression leading to its down-regulation.

4) Discussion

Ivermectin is a commonly used anthelmintic drug that is known to interact with the ABC efflux transporter ABCB1 (Lespine et al., 2007). Ivermectin resistance in nematodes is partly explained by the over-expression of some ABC proteins. By modulating the drug concentration at their target, they may compromise its efficacy. Such over expressions have been described for *C.elegans*, and a lot of field parasites resistant to ivermectin, such as *H. contortus*, *T. circumcincta*, *P. equorum*, *O. volvulus* (Lespine A., 2012). However, nothing is known about the mechanisms responsible for these over-expressions in resistant nematodes. Recently, in mice, an ivermectin-dependent up-regulation of *Abcb1* gene expression both *in vitro* (Ménez et al., 2012a) and *in vivo* (Albérich et al., 2014) was reported. We therefore investigate the transcriptional mechanisms underlying such *Abcb1* up-regulations in response to ivermectin.

At a transcriptional level, numerous nuclear receptors (NRs) and other transcription factors, regulate hepatic and intestinal cytochromes and ABC transporters in response to exogenous and endogenous activators (Assem et al., 2004). It was previously demonstrated that ivermectin was not a CAR, PXR or AhR (aryl-hydrocarbon receptor) ligand (Ménez et al., 2012a). Since LXR (ElAli and Hermann, 2012), FXR (Jiang et al., 2013), NRF2 (Aleksunes and Klaassen, 2012; Wang et al., 2014b) and NF- κ B (Bentires-Alj et al., 2003; Li et al., 2014b) were recently shown to be involved in the regulation of *Abcb1*, we investigated their possible role on ivermectin-induced *Abcb1* over-expression. We therefore studied the expression of selected target genes of each transcriptional pathway, and their own regulation, in response to an ivermectin treatment.

The major gene induction, after ivermectin treatment, was observed for *Il6* mRNA. IL-6 plays a central role in restoring normal hepatic function following liver injury. In hepatocytes, IL-6 is recognized as a stimulus to begin production of acute phase proteins (Michalopoulos, 2007; Taub, 2004). Although, IL-6 is generally considered as a protective cytokine shown to protect hepatocytes during acute hepatic injury (Klein et al., 2005). Many studies reported that avermectin was closely related to oxidative stress (Zhu et al., 2013). Moreover, previous report showed that the activities of antioxidant enzymes were decreased by avermectin (El-Shenawy, 2010; Li et al., 2013) and related to an increase in the content of oxidative products and in mRNA levels of inflammatory factors (IL1 beta, TNF alpha, and IL4) (Liu et al., 2014). In pigeon brain, such induction of expression of inflammatory factors (iNOS) was correlated to inflammatory and histopathological damages (Chen et al., 2013). In agreement

with such results, one can speculate that ivermectin exposure induced an acute inflammation in hepatocytes that led to an increase in mRNA level of the inflammatory factor *Il6*.

However, some other studies show that ivermectin, as well as avermectin, markedly suppress the LPS-induced cytokine production (TNF, IL1 and IL6) *in vitro* and *in vivo* in mice, by suppressing NF- κ B pathway (Ci et al., 2009; Zhang et al., 2008). Abamectin was shown to inhibit the production of IL6 in mice with LPS-induced injury, suggesting that abamectin had potent anti inflammatory effect (Zhang et al., 2010). So, on one hand, ivermectin was shown to decrease the expression and production of inflammatory factor when there was an injury caused by LPS through NF- κ B inhibition; on the other hand, ivermectin was shown to cause higher expression of inflammation factor indicating ivermectin toxicity through the activation of NF- κ B. These discrepancies could be due to differences in LPS-induced versus non induced response to macrocyclic lactones, in concentration and in tissue specificity. They could be fully explained by a previous report showing that NF- κ B could play a dual role in the regulation of gene and particularly of *ABCB1*, as a transcriptional repressor in cells that have been chronically exposed to chemotherapeutic agents and as an intermediate for rapid activation in response to stress (Sui et al., 2012). Avermectin, a macrocyclic lactone structurally close to ivermectin, was shown to induce ABCB1 protein expression dependently of NF- κ B activation (Luo et al., 2013b). As previous study reported that the activation of *Abcb1* occurred via the activation of an NF- κ B binding site within *Abcb1* promoter (Zhou and Kuo, 1997), we then investigated whether NF- κ B could be modulated by ivermectin and responsible for the up-regulation of *Abcb1a* and *Abcb1b*. We evaluated the effect of the NF- κ B inhibitor BAY-11-7082 on the ivermectin-induced expression of *Abcb1a* and *Abcb1b*. However, BAY-11-7082 had only a very poor tendency to abolish these up-regulations. Actually, ivermectin did not behave like the reference NF- κ B activator, TNF- α , whose activating effect was well inhibited by BAY. This poor reversal effect observed on *Abcb1* expressions after exposure to the NF- κ B inhibitor suggests that the up-regulations observed in response to ivermectin, were only partially dependent of NF- κ B pathway. This observation is similar to the only partial inhibition of ivermectin-induced over-expression of *Il6*, which is the marker of NF- κ B pathway, suggesting that ivermectin-mediated up-regulation of *Il6* and *Abcb1* both involves also other pathways. However, the role of NF- κ B in regulating *Abcb1* gene expression by ivermectin exposure could be indirect. By using an inhibitor that blocks the translocation of NF- κ B into the nucleus, we were able to evaluate the possible involvement of NF- κ B in the regulation of *Abcb1* through its direct binding on gene promoter regions. Two different indirect involvements of NF- κ B could be envisaged. Firstly, NF- κ B

was demonstrated to be activated in liver by an I- κ B-independent pathway. One can therefore speculate that the effect herein presented in response to ivermectin could be explained by such NF- κ B pathway. Indeed, *I κ B* expression was shown to require, independently of the I- κ B phosphorylation, glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) which activates NF- κ B by phosphorylating its P65 subunit directly in the nucleus (Steinbrecher et al., 2005). Thus, the use of other inhibitor, such as a GSK-3 β inhibitor, should be envisaged to adequately define the NF- κ B involvement in *Abcb1* up-regulations observed after ivermectin exposure. Secondly, since P450 cytochrome enzymes, which share common transcriptional regulations as *ABCB1* through Ahr, CAR, GR, PXR, RXR, PPAR, FXR and LXR, have been shown to be indirectly regulated by NF- κ B through mutual regulation of such nuclear receptors (Zordoky and El-Kadi, 2009), one can speculate that the partial effect of NF- κ B in our study could be mediated by others transcription factors. All together, it is reasonable to think that the ivermectin-induced regulation of *Abcb1* arises, at least partially, through the NF- κ B pathway.

Since LXR was recently shown to be involved in the regulation of *ABCB1* (ElAli and Hermann, 2012; Saint-Pol et al., 2013), we also decided to investigate the ability of ivermectin to activate LXR pathway by studying the expression of its target genes. Our results indicate that ivermectin was not able to induce this pathway. As a recent report showed that ivermectin is a partial agonist of FXR displaying properties in modulating coregulator recruitment (Jin et al., 2013), some ivermectin-mediated effect described in our study may occur through FXR activation. Indeed, it has been previously demonstrated that FXR agonists can modulate the expression of other ABC transporters such as *ABCC2* (Kast et al., 2002) and *ABCG2* (Herraez et al., 2012). Moreover, the overlap of target sequences of FXR with those of other nuclear receptors, such as PXR and CAR, and its potential regulation of LXR, indicates that FXR plays a pleiotropic role in the regulation of a number of genes (Wang et al., 2003). In contrast, but in agreement with our result, *ABCB1* was demonstrated not to be regulated by FXR (Chisaki et al., 2009; Chow et al., 2011). All together, these results suggest that the ivermectin-induced regulations of *Abcb1* expression herein presented are not explained by LXR or FXR pathway activations. The activation of these two pathways, by known ligand, in our model may be verified in order to confirm such results. Finally, post-transcriptional mechanisms, such as mRNA stabilization, should also be considered as they have been shown to play a major role in *Abcb1* regulations (Ménez et al., 2012a).

Our results have also shown that ivermectin induced the expression of *Nrf2* and its target gene *Hqo1*. Recently, NRF2 activation was associated with an adaptative response to oxidative stress (Li et al., 2014a) induced by polychlorinated biphenyl (PCB) exposure. One can

therefore speculate that a putative ivermectin-dependent production of oxidative stress could activate NRF2. NRF2 was also described to induce *Il6* expression by its direct binding on *Il6* promoter region in response to oxidative stress (Wruck et al., 2011). Such result could explain the high ivermectin-mediated induction of *Il6* gene over-expression, by an additive effect with the NF- κ B pathway. Since NRF2 was also described to induce the homologous of mammalian *ABCB1* in *Drosophila* in response to multiple xenobiotic exposures (Misra et al., 2014), one can also assume that the induced expression of *Abcb1* in our experiment could be explained partially by NRF2 activation.

The elucidation of the molecular mechanism involved in ABC efflux transporters could be a powerful tool to further develop new targets or therapeutic agents antagonizing such over-expressions and could allow enhancing ivermectin efficacy in host, and reversing resistance in parasites. Indeed, antagonizing such pathways could potentially down-regulate these ivermectin-induced gene over-expressions, and potentiate ivermectin efficacy.

In conclusion, further experiments should be done to elucidate ivermectin up-regulation mechanisms on *Abcb1* expression, depending on NF- κ B and NRF2 pathways.

In summary, our study demonstrates that the *Abcb1a* and *Abcb1b* induced expressions in response to ivermectin occur partially through NF- κ B and NRF2 pathways. This study shows that ivermectin causes a markedly induction of IL6 that could reflect an inflammation related to an ivermectin-induced oxidative stress.

References

- Albérich, M., C. Menez, J.F. Sutra and A. Lespine, 2014, Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes in vitro and in vivo in mice, *Eur J Pharmacol* 740, 428.
- Aleksunes, L.M. and C.D. Klaassen, 2012, Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice, *Drug Metab Dispos* 40, 1366.
- Ardelli, B.F., 2013, Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes, *Parasitol Int* 62, 639.
- Arias, A., J.P. Rigalli, S.S. Villanueva, M.L. Ruiz, M.G. Luquita, V.G. Perdomo, M. Vore, V.A. Catania and A.D. Mottino, 2014, Regulation of expression and activity of multidrug resistance proteins MRP2 and MDR1 by estrogenic compounds in Caco-2 cells. Role in prevention of xenobiotic-induced cytotoxicity, *Toxicology* 320, 46.
- Assem, M., E.G. Schuetz, M. Leggas, D. Sun, K. Yasuda, G. Reid, N. Zelcer, M. Adachi, S. Strom, R.M. Evans, D.D. Moore, P. Borst and J.D. Schuetz, 2004, Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice, *J Biol Chem* 279, 22250.
- Bentires-Alj, M., V. Barbu, M. Fillet, A. Chariot, B. Relic, N. Jacobs, J. Gielen, M.P. Merville and V. Bours, 2003, NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells, *Oncogene* 22, 90.
- Chen, L.J., B.H. Sun, J.P. Qu, S. Xu and S. Li, 2013, Avermectin induced inflammation damage in king pigeon brain, *Chemosphere* 93, 2528.
- Chisaki, I., M. Kobayashi, S. Itagaki, T. Hirano and K. Iseki, 2009, Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver, *Biochim Biophys Acta* 1788, 2396.
- Chow, E.C., M.R. Durk, C.L. Cummins and K.S. Pang, 2011, 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 up-regulates P-glycoprotein via the vitamin D receptor and not farnesoid X receptor in both *fxr(-/-)* and *fxr(+/+)* mice and increased renal and brain efflux of digoxin in mice in vivo, *J Pharmacol Exp Ther* 337, 846.
- Ci, X., H. Li, Q. Yu, X. Zhang, L. Yu, N. Chen, Y. Song and X. Deng, 2009, Avermectin exerts anti-inflammatory effect by downregulating the nuclear transcription factor kappa-B and mitogen-activated protein kinase activation pathway, *Fundam Clin Pharmacol* 23, 449.
- El-Shenawy, N.S., 2010, Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes, *Toxicol In Vitro* 24, 1148.
- ElAli, A. and D.M. Hermann, 2012, Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells, *Brain Pathol* 22, 175.
- Fitzpatrick, J.L., 2013, Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists, *Vet Parasitol* 195, 233.
- Fox, L.M., 2006, Ivermectin: uses and impact 20 years on, *Curr Opin Infect Dis* 19, 588.

- Harmsen, S., I. Meijerman, R.F. Maas-Bakker, J.H. Beijnen and J.H. Schellens, 2013, PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors, *Eur J Pharm Sci* 48, 644.
- Hashmi, S., W. Tawe and S. Lustigman, 2001, *Caenorhabditis elegans* and the study of gene function in parasites, *Trends Parasitol* 17, 387.
- Hattinger, C.M., G. Stoico, F. Michelacci, M. Pasello, I. Scionti, D. Remondini, G.C. Castellani, M. Fanelli, K. Scotlandi, P. Picci and M. Serra, 2009, Mechanisms of gene amplification and evidence of coamplification in drug-resistant human osteosarcoma cell lines, *Genes Chromosomes Cancer* 48, 289.
- Herraez, E., E. Gonzalez-Sanchez, J. Vaquero, M.R. Romero, M.A. Serrano, J.J. Marin and O. Briz, 2012, Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins, *Mol Pharm* 9, 2565.
- Jiang, Y., J. Jin, P. Iakova, J.C. Hernandez, N. Jawanmardi, E. Sullivan, G.L. Guo, N.A. Timchenko and G.J. Darlington, 2013, Farnesoid X receptor directly regulates xenobiotic detoxification genes in the long-lived Little mice, *Mech Ageing Dev* 134, 407.
- Jigorel, E., M. Le Vee, C. Boursier-Neyret, Y. Parmentier and O. Fardel, 2006, Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes, *Drug Metab Dispos* 34, 1756.
- Jin, L., X. Feng, H. Rong, Z. Pan, Y. Inaba, L. Qiu, W. Zheng, S. Lin, R. Wang, Z. Wang, S. Wang, H. Liu, S. Li, W. Xie and Y. Li, 2013, The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism, *Nat Commun* 4, 1937.
- Kaplan, R.M. and A.N. Vidyashankar, 2012, An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance, *Vet Parasitol* 186, 70.
- Kast, H.R., B. Goodwin, P.T. Tarr, S.A. Jones, A.M. Anisfeld, C.M. Stoltz, P. Tontonoz, S. Kliewer, T.M. Willson and P.A. Edwards, 2002, Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor, *J Biol Chem* 277, 2908.
- Klein, C., T. Wustefeld, U. Assmus, T. Roskams, S. Rose-John, M. Muller, M.P. Manns, M. Ernst and C. Trautwein, 2005, The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury, *J Clin Invest* 115, 860.
- Kurose, K., M. Saeki, M. Tohkin and R. Hasegawa, 2008, Thyroid hormone receptor mediates human MDR1 gene expression-Identification of the response region essential for gene expression, *Arch Biochem Biophys* 474, 82.
- Lemmen, J., I.E. Tozakidis, P. Bele and H.J. Galla, 2013, Constitutive androstane receptor upregulates *Abcb1* and *Abcg2* at the blood-brain barrier after CITCO activation, *Brain Res* 1501, 68.
- Lespine, A., S. Martin, J. Dupuy, A. Roulet, T. Pineau, S. Orłowski and M. Alvinerie, 2007, Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship, *Eur J Pharm Sci* 30, 84.

- Lespine A., M.C., Bourguinat C., Prichard R.K., 2012, P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependant anthelmintic resistance, *Int J Parasitol* 2, 58.
- Li, L., H. Dong, E. Song, X. Xu, L. Liu and Y. Song, 2014a, Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling, *Chem Biol Interact* 209, 56.
- Li, M., T.Z. You, W.J. Zhu, J.P. Qu, C. Liu, B. Zhao, S.W. Xu and S. Li, 2013, Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin, *Ecotoxicology* 22, 1241.
- Li, Y., L. Huang, X. Zeng, G. Zhong, M. Ying, M. Huang and H. Bi, 2014b, Down-regulation of P-gp expression and function after Mulberroside A treatment: potential role of protein kinase C and NF-kappa B, *Chem Biol Interact* 213, 44.
- Liu, C., M. Li, Y. Cao, J.P. Qu, Z.W. Zhang, S.W. Xu and S. Li, 2014, Effects of avermectin on immune function and oxidative stress in the pigeon spleen, *Chem Biol Interact* 210, 43.
- Luo, L., Y.J. Sun, L. Yang, S. Huang and Y.J. Wu, 2013, Avermectin induces P-glycoprotein expression in S2 cells via the calcium/calmodulin/NF-kappaB pathway, *Chem Biol Interact* 203, 430.
- Lustigman, S., R.K. Prichard, A. Gazzinelli, W.N. Grant, B.A. Boatman, J.S. McCarthy and M.G. Basanez, 2012, A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis, *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1582.
- Ménez, C., L. Mselli-Lakhal, M. Foucaud-Vignault, P. Balaguer, M. Alvinerie and A. Lespine, 2012a, Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line, *Biochem Pharmacol* 83, 269.
- Ménez, C., L. Mselli-Lakhal, M. Foucaud-Vignault, P. Balaguer, M. Alvinerie and A. Lespine, 2012b, Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line, *Biochem Pharmacol* 83, 269.
- Michalopoulos, G.K., 2007, Liver regeneration, *J Cell Physiol* 213, 286.
- Misra, J.R., M.A. Horner, G. Lam and C.S. Thummel, 2014, Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*, *Genes Dev* 25, 1796.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65, 55.
- Narang, V.S., C. Fraga, N. Kumar, J. Shen, S. Throm, C.F. Stewart and C.M. Waters, 2008, Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier, *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C440.
- Pierce, J.W., R. Schoenleber, G. Jesmok, J. Best, S.A. Moore, T. Collins and M.E. Gerritsen, 1997, Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo, *J Biol Chem* 272, 21096.
- Rodrigues, A.C., R. Curi, M.H. Hirata and R.D. Hirata, 2009, Decreased ABCB1 mRNA expression induced by atorvastatin results from enhanced mRNA degradation in HepG2 cells, *Eur J Pharm Sci* 37, 486.

- Saint-Pol, J., P. Candela, M.C. Boucau, L. Fenart and F. Gosselet, 2013, Oxysterols decrease apical-to-basolateral transport of Ass peptides via an ABCB1-mediated process in an in vitro Blood-brain barrier model constituted of bovine brain capillary endothelial cells, *Brain Res* 1517, 1.
- Sike, A., E. Nagy, B. Vedelek, D. Pusztai, P. Szeremy, A. Venetianer and I.M. Boros, 2014, mRNA levels of related Abcb genes change opposite to each other upon histone deacetylase inhibition in drug-resistant rat hepatoma cells, *PLoS One* 9, e84915.
- Steinbrecher, K.A., W. Wilson, 3rd, P.C. Cogswell and A.S. Baldwin, 2005, Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription, *Mol Cell Biol* 25, 8444.
- Sui, H., Z.Z. Fan and Q. Li, 2012, Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells, *J Int Med Res* 40, 426.
- Taub, R., 2004, Liver regeneration: from myth to mechanism, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 836.
- Wang, W., H.L. McLeod and J. Cassidy, 2003, Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines, *Int J Cancer* 104, 504.
- Wang, X., C.R. Campos, J.C. Peart, L.K. Smith, J.L. Boni, R.E. Cannon and D.S. Miller, 2014, Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers, *J Neurosci* 34, 8585.
- Wruck, C.J., K. Streetz, G. Pavic, M.E. Gotz, M. Tohidnezhad, L.O. Brandenburg, D. Varoga, O. Eickelberg, T. Herdegen, C. Trautwein, K. Cha, Y.W. Kan and T. Pufe, 2011, Nrf2 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL-6 promoter, *J Biol Chem* 286, 4493.
- Zhang, X., J. Li, C. Chen, X. Ci, Q. Yu, X. Zhang and X. Deng, 2010, Protective effect of abamectin on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice, *Fundam Clin Pharmacol* 25, 700.
- Zhang, X., Y. Song, X. Ci, N. An, Y. Ju, H. Li, X. Wang, C. Han, J. Cui and X. Deng, 2008, Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice, *Inflamm Res* 57, 524.
- Zhou, G. and M.T. Kuo, 1997, NF-kappaB-mediated induction of mdr1b expression by insulin in rat hepatoma cells, *J Biol Chem* 272, 15174.
- Zhu, W.J., M. Li, C. Liu, J.P. Qu, Y.H. Min, S.W. Xu and S. Li, 2013, Avermectin induced liver injury in pigeon: mechanisms of apoptosis and oxidative stress, *Ecotoxicol Environ Saf* 98, 74.
- Zordoky, B.N. and A.O. El-Kadi, 2009, Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes, *Curr Drug Metab* 10, 164.

CHAPITRE 3

Le récepteur nucléaire NHR-A est impliqué dans la sensibilité et le développement de la résistance à l'ivermectine chez *C. elegans*

Nuclear Hormone Receptor NHR-A is implicated in ivermectin susceptibility and resistance development in *Caenorhabditis elegans*

Dans ce chapitre, nous avons évalué l'impact d'une déficience en facteur de transcription sur la sensibilité à l'ivermectine et le développement de la résistance à ce médicament chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*.

Cette étude montre que la déficience en *nhr-a** augmente la sensibilité à l'ivermectine chez la lignée sensible. De plus, la déficience en *nhr-a* restaure partiellement la sensibilité à l'ivermectine chez une lignée résistante. Enfin, les animaux dépourvus de *nhr-a* ne peuvent devenir résistants à l'ivermectine.

Cette étude suggère que *nhr-a* pourrait être responsable de l'induction des gènes codant pour les enzymes du métabolisme des xénobiotiques à l'ivermectine. L'induction de ces gènes est à l'heure actuelle le mécanisme le plus décrit lors de résistance aux lactones macrocycliques. La mise en évidence de l'implication de *nhr-a* dans la sensibilité à l'ivermectine pourrait permettre de le définir comme cible thérapeutique afin de potentialiser l'efficacité de ce médicament.

* pour des raisons de confidentialité, *nhr-a* est un nom emprunté en vue de déposer un brevet.

1) Introduction

Helminth infections cause the highest economical losses in livestock related to lower of productivity (Charlier et al., 2014; Fitzpatrick, 2013). The major control of these parasites is mainly achieved through the use of anthelmintic drug. The drug most commonly used to treat parasitic nematode infection is the macrocyclic lactone ivermectin. Indeed, ivermectin is a really potent drug with a broad spectrum of activity and consequently has been used massively since its commercialization in 1981. The continuous use of this drug has contributed to widespread development of ivermectin resistant parasites all over the world (Kaplan and Vidyashankar, 2012). Understanding drug resistance development is important for optimizing control and reducing further selection for resistance. Multi Drug Resistance (MDR) ABC transporters have been implicated in drug resistance, by diminishing drug concentration, in many organisms such as mammalian cancer cell, protozoa, fungi, bacteria and nematodes. Many homologues of ABC transporters are found in the genome nematode (Ardelli, 2013). In nematodes resistant to macrocyclic lactones, the ABC transporter belonging to families B and C have been suggested to have a role in resistance. Studies of ABC transporters in nematodes have shown an association with drug selection when drug-treated and non-treated populations were compared (Ardelli and Prichard, 2004; Blackhall et al., 1998; Eng and Prichard, 2005). Moreover, Multi Drug Reversing agent, have been shown to improve efficacy in drug resistant and sensitive nematode populations (Ardelli and Prichard, 2013; Bartley et al., 2009). Ivermectin resistance in nematodes is partly explained by the over-expression of numerous of these homologues. By modulating the drug concentration at their target, they compromise its efficacy. It has been described for *C.elegans*, and lot of field parasites resistant to ivermectin such as *H. contortus*, *T. circumcincta*, *P. equorum* and *O. volvulus* (Lespine A., 2012). However, nothing is known about the mechanisms responsible for these over-expressions in resistant nematodes. In mammals, ABC efflux transporters have been shown to be mainly regulated, at transcriptional level, by nuclear receptors (NR) named “xenosensor” such as CAR, PXR, FXR (Chen et al., 2012). Lot of nuclear receptors are widely recognized to play an important role in up-regulating genes of detoxification system in mammals after xenobiotic exposure and can lead subsequently to a limiting drug exposure. Only few studies have investigated the regulation of ABC efflux transporter genes occurring in response to ivermectin. In mammals, the regulation of a member of ABC transporter family, ABCB1, has been shown to occur at post transcriptional level through the stabilization of its mRNA (Ménez et al., 2012a). Recently, ivermectin was also demonstrated to be a partial agonist of the NR FXR (Jin et al., 2013). In

nematodes, NRs have been isolated and studied in several parasites such as *B. malayi*, *O. volvulus* and *D. immitis* (Wu and LoVerde, 2011). In the free living nematode *C. elegans*, of the 284 predicted genes, 269 NRs are thought to be derived from extensive duplication and diversification of an ancestral gene most closely related to the mammalian and *Drosophila* HNF4 receptors (Robinson-Rechavi et al., 2005). The remaining 15 are directly orthologous to NRs found in *Drosophila* and mammals (Van Gilst et al., 2002). Among them, 3 members of the NR1I subfamily, Daf-12, NHR-48 and NHR-8, are related to mammalian xenosensors (Lindblom and Dodd, 2006; Lindblom et al., 2001). DAF-12 is the homologous to the vertebrate Vit D Receptor (VDR) and is known to regulate dauer formation (Motola et al., 2006) whilst NHR-48 is the least well characterized. NHR-8 has a known function in xenobiotic metabolism and is required for xenobiotic resistance (Lindblom et al., 2001). Another transcription factor, *nhr-176*, has recently been implicated in mediating drug resistance to the anthelmintic thiabendazole (Jones et al., 2013). NHR-49 and NHR-80 are homologous of mammalian HNF-4 family that regulate fatty acid desaturation and lipid homeostasis (Webster et al., 2013). NHR-80 is required in the regulation of lifespan extension in animals lacking a germ line (Goudeau et al., 2011). Other transcription factors may also regulate some xenobiotic response. HCF-1 is an evolutionarily conserved transcriptional co-regulator of transcription factor key to cell cycle progression, aging and stress response (Rizki et al., 2011). HCF-1 prolongs lifespan and increases resistance to oxidative stress (Li et al., 2008). Recently, HCF-1 was shown to inhibit SKN-1 (Rizki et al., 2012). The transcription factor SKN-1 is the homologous of mammalian NRF-2. SKN-1 is activated by oxidants, electrophiles and diverse xenobiotics and confers resistance by activating multiple xenobiotic detoxification genes (Choe et al., 2012; Przybysz et al., 2009). SKN-1, in collaboration with DAF-16, plays an important role in regulating stress resistance and longevity genes in xenobiotic stressed old worm (Przybysz et al., 2009). DAF-16 is the homologous of mammalian FOXO transcription factor and promotes in *C. elegans* the proliferation of germ line cells (Berman and Kenyon, 2006). The Aryl hydrocarbon Receptor (Ahr) regulates the xenobiotic metabolism in mammals (Stejskalova et al., 2011) and is also expressed in *C. elegans* but it is poorly characterized. Finally, a recent report has demonstrated that transcriptional response to xenobiotic stress in *C. elegans* was regulated by Nuclear Hormone Receptors (Jones et al., 2013).

In that context, the aim of this study was to investigate the involvement of various transcription factors in ivermectin susceptibility in nematode. The *Caenorhabditis elegans* nematode model was used as a suitable *in vitro* model to study parasitic nematode. A resistant strain previously selected (James and Davey, 2009) from the parental Bristol N2 strain

(unselected and fully susceptible to macrocyclic lactone) with increasing concentrations of ivermectin was used. The level of resistance of this strain is comparable to the natural ivermectin resistance found in field isolates of parasitic nematodes. It makes an excellent *in vitro* model to study ivermectin resistance in nematode. The objectives of this study were to investigate the involvement of transcription factor in ivermectin susceptibility and ivermectin resistance development in *C. elegans*.

2) Materials and Methods

2.1 Materials

Ampicillin, dimethylsulfoxide (DMSO), carbenicillin (CARB), Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and ivermectin (IVM) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). Culture plates were supplied by Sarstedt (Orsay, France). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

2.2 *Caenorhabditis elegans* culture

Nematodes used in the present study were wild-type N2 Bristol, *nhr-a* mutant, *daf-12* mutant, *daf-16* mutant, *nhr-48* mutant, *nhr-49* mutant, *skn-1* mutant originally obtained from the Caenorhabditis Genetics Center (funded by the NIH National Center for Research Resource, USA) and IVR10 strain. IVR10, phenotypically resistant to 10 ng/ml of ivermectin (James and Davey, 2009), were kindly provided by Dr C. E. James. All strains were maintained on nematode growth medium (NGM) plates seeded with *Escherichia coli* OP50 at 21 °C as described previously (Brenner, 1974). For IVR10, 10 ng/ml of ivermectin was added to agar plate. Synchronous population was obtained by washing asynchronous population with majority of gravid adults off the plate into centrifuge tubes. All larval stages except eggs were lysed with a bleaching mixture. Third washes of M9 were done to retire the toxic bleaching mixture. Synchronous L1 were obtained from eggs after agitating overnight into M9 buffer without OP50 at 21 °C.

2.3 Larval development assays (LDA)

Larval development assay consisting in exposure to increasing concentrations of ivermectin were performed from L1-larval stage in 12-well sterile NGM plate that had been seeded with OP50 or HT115 or HT115_*nhr-a*. Appropriate quantity of ivermectin stock solutions was added to the NGM to make drug concentration ranges on the 12-well plates. Ivermectin was added in a range of 0-8 ng/ml (0-9.1 nM) for N2 Bristol and mutants, and 0-24 ng/ml (0-27.4 nM) for IVR 10. Plates used in the assay were freshly prepared for each experiment in 12- well plates. 24 hours after the plates had been poured, 15 μ l of *Escherichia coli* OP50 fresh culture was spread. The plates were incubated at room temperature for 72 hours until L1 larvae were spread. Synchronous L1 larvae were transferred to the plate (20-30 per well) and were allowed to grow at 21 °C until young adult stage. For each condition, only animals reaching the adult stage were scored.

2.4 *nhr* silencing by RNAi

nhr RNAi clone from the Ahringer's library was grown overnight at 37°C in LB containing ampicillin (50 µg/ml). 15 µl *nhr* RNAi was spread on 12- well plates NGM supplemented with increasing concentration of ivermectin, carbenicillin (12.5 µg/ml) and 1mM IPTG to induce RNAi expression.

2.5 Ivermectin resistance development in *C. elegans* N2 Bristol and *nhr-a* mutant strains

Culture conditions to create ivermectin resistant strains of *C. elegans* was previously described (James and Davey, 2009). Briefly, N2 Bristol and *nhr-a* mutant strains were started to be cultured on NGM containing 1 ng/ml and 0.5 ng/ml of ivermectin, respectively. These concentrations correspond to the highest concentration allowing 100% of development to the adult stage. Each week, *C. elegans* were transferred onto new NGM plates. When worms survived and reproduced, they were transferred onto plates containing higher doses of ivermectin. The ivermectin concentrations used to create both resistant strains were 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 ng/ml.

2.6 Statistical analysis

The curve fitting for larval development assay was performed by GraphPad Prism 4 Software (GraphPad, SanDiego, CA, USA) and allowed to calculate IC₅₀ values. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tuckey post-test to compare the effect of ivermectin on N2 Bristol with mutants, while individual comparisons between pairs of data were performed using the Mann-Whitney test (GraphPad InStat, San Diego, CA, USA). Data are expressed as mean ± standard deviation (S.D.). Statistical significance was accepted as $P < 0.05$.

3) Results

3.1 Determination of ivermectin susceptibility in ivermectin *Caenorhabditis elegans* sensitive and resistant strains

In order to determine ivermectin susceptibility, we first examine whether ivermectin was able to impact on larval development of both sensitive (N2 Bristol) and resistant (IVR10) strains of *C.elegans*. L1 larvae were exposed for 48h with increasing concentration of ivermectin and larvae reaching the adult stage were scored. The dose-response relationship for ivermectin toward the development in adult stage of both strains is shown in Figure 1.

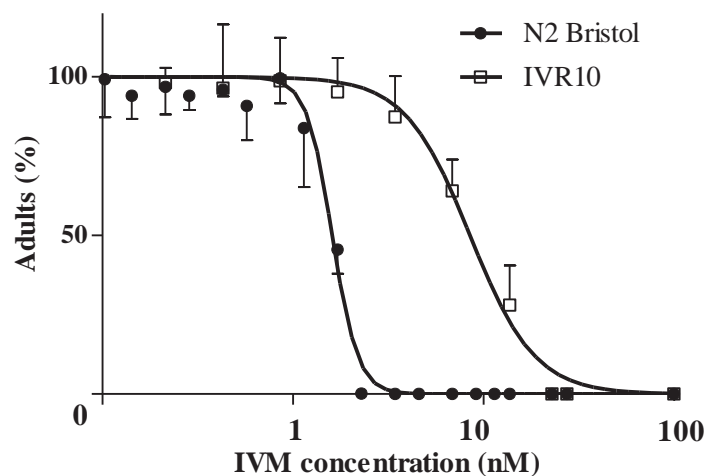


Figure 1. Effect of ivermectin on *C. elegans* larval development of N2 Bristol strain (circle) and of IVR10 strain (square). Values represent the percentage of L1 reaching the adult stage after 48 hours of incubation at 21 °C within the presence of increasing concentrations of ivermectin. Data are mean \pm S.D. from 7-10 independent experiments.

Both strains were susceptible to ivermectin. However, the effect of ivermectin on *C. elegans* larval development was different from N2 Bristol strain to IVR10 strain. As expected, the concentration of ivermectin required to inhibit 50 % of larval development was lower in ivermectin sensitive strain than in ivermectin resistant one. The effective IC_{50} values (concentration that caused 50% of non-development of larvae in adult stage) of both strains were significantly different: 1.5 ± 0.2 nM and 8.4 ± 1.5 nM in N2 Bristol and IVR10 strains, respectively (***, $P < 0.005$). Then, IVR10 was less susceptible to ivermectin than wild-type animals. By calculating the resistance factor (RF) which is the ratio of IC_{50} in IVR10 strain to IC_{50} in N2 Bristol strain, IVR10 appeared 5.3 more resistant than the parental strain to ivermectin.

3.2 Effect of nuclear receptor deficiency on ivermectin susceptibility in *Caenorhabditis elegans*

We examined then whether mammalian transcription factor homologous in *C.elegans* could play a role in the susceptibility to ivermectin. To identify putative nuclear receptor candidates in ivermectin susceptibility, we studied the development of nuclear receptor deficient strains of *C.elegans* in response to ivermectin. The IC₅₀ and RF values for each mutant are listed in Table 1.

Table 1. Influence of nuclear receptor deficiency on susceptibility to ivermectin in *C. elegans* mutant strains

<i>C. elegans</i> strains	IC ₅₀ (nM)	RF
N2 Bristol	1.52 ± 0.20 **	
<i>nhr-a</i> mutant	0.96 ± 0.10	0.63
<i>nhr-b</i> mutant	1.73 ± 0.11	1.14
<i>nhr-c</i> mutant	1.20 ± 0.12	0.78
<i>nhr-d</i> mutant	1.46 ± 0.13	0.95
<i>nhr-e</i> mutant	1.65 ± 0.07	1.08
<i>nhr-f</i> mutant	1.27 ± 0.38	0.83
<i>nhr-g</i> mutant	1.47 ± 0.33	0.96
<i>nhr-h</i> mutant	1.29 ± 0.28	0.85
<i>nhr-i</i> mutant	2.00 ± 0.73	1.32

IC₅₀ is the concentration needed by 50 % of animal to reach the adult stage of L1 *C. elegans*. IC₅₀ value is calculated from the mean curve of 2-10 experiments. Resistance Factor (RF) is the ratio of IC₅₀ in mutant strain to IC₅₀ in N2 Bristol strain. Data are mean ± S.D. from 2-10 independent experiments. ** P < 0.01.

nhr-a mutant was the only one altered on its development on ivermectin. Table 1 shows that IC₅₀ value was significantly 40 % lowered by *nhr-a* deficiency compared with parental strain (P<0.01), leading to a RF inferior to 1 (0.63). Indeed, IC₅₀ were 1.52 ± 0.20 nM and 0.96 ± 0.10 nM for N2 Bristol and *nhr-a* mutant, respectively. By contrast, the other mutants

deficient in nuclear receptor shared the same susceptibility to ivermectin compared with wild type animals, suggesting that they were not implicated in ivermectin susceptibility.

All together, these results suggest that *nhr-a* is involved in ivermectin susceptibility.

3.3 Effect of *nhr-a* silencing on susceptibility to ivermectin in *Caenorhabditis elegans* susceptible and resistant strains

To determine whether *nhr-a* is required for ivermectin susceptibility in resistant strain, we compared the impact of *nhr-a* silencing in N2 Bristol and IVR10 strains, using RNAi by feeding on larval development. The dose-response relationship for ivermectin toward the development in adult stage of both strain on HT115 or on HT115-*nhr-a* RNAi is represented Figure 2. The IC₅₀ and RF values for both strain on control food HT115 or HT115-*nhr-a* or HT115-*nhr-b* are listed Table 2.

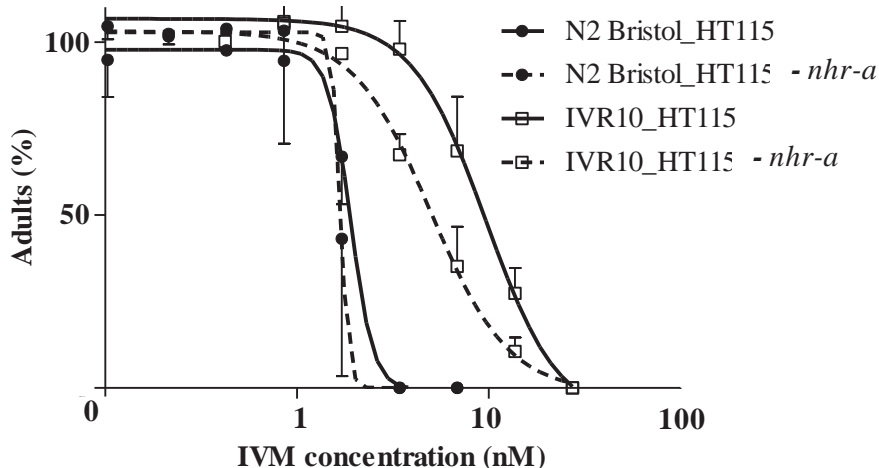


Figure 2. Effect of *nhr-a* silencing (dotted line) on susceptibility to ivermectin in *C. elegans* larval development of N2 Bristol strain (circle) and IVR10 strain (square). Values represent the percentage of L1 reaching the adult stage after 48 hours of incubation at 21 °C within the presence of increasing concentrations of ivermectin. Data are mean \pm S.D. from 2 independent experiments.

Table 2. Influence of nuclear receptor silencing on susceptibility to ivermectin in *C. elegans* both sensitive and resistant to ivermectin

	IC ₅₀ (nM)		RF
	N2 Bristol	IVR10	
HT115	1.90 ± 0.10	9.05 ± 0.26	4.8
HT115- <i>nhr-a</i>	1.15 ± 0.44 *	5.16 ± 0.91 #	2.7
HT115- <i>nhr-b</i>	1.74	8.67	4.6

IC₅₀ is the concentration needed for half development of L1 *C. elegans* in adults. IC₅₀ value is calculated from the mean curve of 2 experiments from Fig. 2A. Data are mean ± S.D. from 2 independent experiments. * P < 0.05 vs N2 Bristol on HT115, # P < 0.05 vs IVR10 on HT115. Resistance Factor (RF) is the ratio of IC₅₀ in IVR10 strain to IC₅₀ in N2 Bristol strain_HT115

Silencing *nhr-a* by feeding in N2 Bristol strain led to a significant decrease of IC₅₀ values confirming *nhr-a* implication in ivermectin susceptibility (1.90 ± 0.10 nM versus 1.15 ± 0.44 nm, P < 0.05). IVR10 curve development clearly showed a shift to the left when *nhr-a* was silenced, reflecting a decrease in ivermectin susceptibility in resistant strain (Figure 2). Indeed, the IC₅₀ for IVR10 on HT115 was 9.05 ± 0.26 nM and significantly lower at 5.16 ± 0.91 nM on HT115-*nhr-a* (Table 2, P < 0.05). Based on the IC₅₀ values, the ivermectin-resistant strain on HT115-*nhr-a* was 1.7-fold more susceptible to ivermectin compared with IVR10 on HT115. Consequently, when *nhr-a* is silenced in IVR10 strain, the RF of IVR10 is lowered from 4.8 to 2.7. However, the reversal effect was not the same as wild type animal, suggesting an incomplete reversion. Results showed, as expected, that *nhr-b* silencing did not cause any change in the development of both strains on ivermectin.

We conclude that *nhr-a* is partially responsible of higher ivermectin tolerance in resistant strain.

3.4 Effect of *nhr-a* deficiency on resistance development to ivermectin in *Caenorhabditis elegans*

Finally, we investigated whether *nhr-a* could be required in ivermectin resistance development. N2 Bristol and *nhr-a* mutant were maintained weekly on fresh media containing ivermectin and when replication and growth rate were normal, worms were transferred to

higher dose of ivermectin. The concentrations required to obtain 100 % of worm survival were 1 ng/ml and 0.5 ng/ml for N2 Bristol and *nhr-a* mutant strains, respectively. In that respect, these concentrations were used as starting concentrations to create ivermectin resistance in both strains. Figure 3 shows the resistance development to ivermectin of N2 Bristol and *nhr-a* mutant strains over a 40 weeks period.

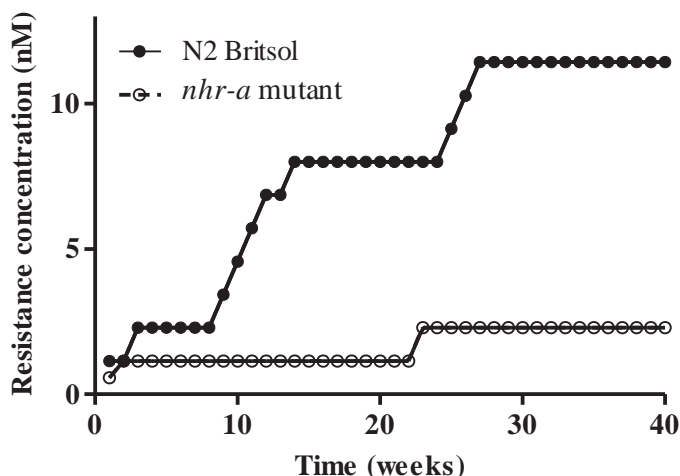


Figure 3. Impact of *nhr-a* deficiency on development of ivermectin resistance in *C. elegans* N2 Bristol strain (black circle) and *nhr-a* mutant strain (empty circle).

Results showed that ivermectin resistance development was different between the two strains. Indeed, N2 Bristol acquired the resistance to ivermectin at the maximal concentration of 10 ng/ml in 27 weeks with 2 marked stagnation at 2.2 and 8.0 nM. *nhr-a* mutants failed to become resistant to ivermectin at the same level of drug concentration compared to wild-type animals. After 40 weeks, *nhr-a* mutant survived only at 2.2 nM and failed to survive at 3.4 nM. In conclusion, *nhr-a* mutant had acquired only 20 % of N2 Bristol acquired level of ivermectin resistance.

Thus, *nhr-a* is required for ivermectin resistance development.

4) Discussion

Anthelmintic resistance is already a serious problem in nematode parasites of livestock. While drug treatment remains the major means of helminth control, there is a need to understand the development of resistance to the drugs.

The first objective was to study the susceptibility of various *C.elegans* strains to ivermectin. Therefore, experimentations were performed on N2 Bristol and IVR10 *C. elegans* strains, susceptible and resistant to ivermectin, respectively. In the present study, as expected, IVR10 strain needed higher ivermectin doses to alter worm development compared with the parental strain. Moreover, the RF value was 5.3, showing that this strain was able to survive to 5-fold higher ivermectin concentrations. These results are in accordance with a previous report showing, using a viability test on IVR10, that EC_{50} was 32.0 ng/ml corresponding to 36.6 nM (James and Davey, 2009). However, in the present study with the LDA, the EC_{50} for the same strain was 8.4 nM. These results strongly suggest that the LDA seemed to be more sensitive as ivermectin effects on development occurred at lower concentration than those require to kill worm. Moreover, larval development assay could be more pertinent as it was comparable to the field parasite drug exposure as L3-L4 larval *C.elegans* stages were exposed to the drug in the present test and not only L1 as described in previous toxicity assay. These results show that LDA could be a good test to evaluate susceptibility of *C. elegans* strain to a drug. This test may allow to compare and/or predict what happen in the field as this test is routinely used to diagnose ivermectin resistance in field parasite (Kaplan et al., 2007).

The transcriptomic response following a toxic insult in nematode has poorly been explored. However, some studies have shown that the *C. elegans* detoxification network is responsive to xenobiotic and particularly macrocyclic lactones (Laing et al, 2010; Menzel et al, 2005; Ardelli et al, 2008; Bygarski et al, 2014; James and Davey, 2009; Yan et al, 2012) but the mechanism of the response is still unknown.

We firstly investigated the potential role of some transcription factors in ivermectin susceptibility. To determine their role in protecting *C. elegans* from ivermectin, the larval development assay was performed in *C. elegans* transcription factor knock-out strain. The development was found to be significantly altered for only one mutant. The deficiency of *nhr-a* significantly enhanced susceptibility of *C. elegans* to ivermectin, showing that *C.elegans* lacking *nhr-a* were more susceptible to ivermectin than parental strain. This strongly suggest that *nhr-a* may be responsible to enhance ivermectin susceptibility in *C. elegans*. This result is in accordance with previous report showing that *nhr* deficiency led to enhance xenobiotic

susceptibility in *C. elegans*. By contrast, none of other transcription factors described in the present study have been shown to be implicated in ivermectin susceptibility in mutant strains. The major ivermectin resistance mechanism is mainly described on parasitic nematode by the over-expression of ABC efflux transporters (Lespine A., 2012). Indeed, these over expressions may contribute to extrude more efficiently ivermectin and may compromise its efficacy. Moreover, biotransformation enzymes seem to be crucial mechanisms in helminth-resistance development. Since genes overexpression can occur through transcriptional up regulation via transcription factor activation, identifying the transcription factor involved in XME gene regulation and knocking it down could constitute a strategy to understand mechanisms of anthelmintic resistance.

To analyze the involvement of *nhr-a* in ivermectin susceptibility in *C. elegans*, we have studied the development of animals after the knock-out of *nhr-a* by RNAi feeding in both susceptible and resistant strains. Silencing *nhr-a* significantly enhanced ivermectin susceptibility in both *C. elegans* strains. The data demonstrated that animals resistant to ivermectin lacking *nhr-a* were affected in their development at lower concentration than IVR10 strain. Indeed, IVR10 strain without *nhr-a* was 1.8-fold less resistant to ivermectin.

Nevertheless, it has to be noted that the reversal effect of *nhr-a* deficiency in resistant strain was partial. Indeed, animals lacking *nhr-a* by silencing were not as susceptible as wild-type animals to ivermectin. Such results could suggest that *nhr-a* is not the only actor on ivermectin susceptibility. A recent report has demonstrated that several of these NHRs are required for the induction of metabolic response after xenobiotic exposure in *C. elegans* (Jones et al., 2013). A combination of transcription factors together may be required for a full reversion. It is also possible that other transcription factors, which were not represented in these RNAi screen, may be required. Indeed, it has recently shown that the transcription factor *nhr-176* modulated the susceptibility of *C. elegans* to the other anthelmintic thiabendazole (Jones et al., 2013). Further analysis should be done to investigate the implication of others nuclear receptors such as *nhr-176*, working in synergism with *nhr-a*, on ivermectin resistance.

The last objective was to investigate whether *nhr-a* was implicated in ivermectin resistance development. Our data show that an ivermectin resistant strain of *C. elegans* was created in 27 weeks at the same ivermectin resistance level as the previous created ivermectin resistant strain IVR10 (James and Davey, 2009). Concerning *nhr-a* mutant, it failed to become resistant to ivermectin at the same level than parental strain. During 40 weeks, it was able to survive at the low concentration of 2.2 nM. It did not develop at the following concentration 3.4 nM. These results clearly demonstrated that without *nhr-a*, worms were not capable to

survive to higher doses of ivermectin. Taken together, these results suggest that *nhr-a* is required in ivermectin resistance development.

Knowing the multiple role of *nhr-a* homologous in regulating detoxification in mammals, one can speculate that animals lacking *nhr-a* could not over-express their ABC efflux transporters, which seemed to be the essential mechanism for parasitic nematode to be resistant to ivermectin (Lespine A., 2012). It is hypothesized that these over expressions may contribute to extrude more efficiently ivermectin from worm target and may compromise its efficacy. This is supported by studies performed on IVR10 demonstrating that exposure to potent P-glycoprotein inhibitors, verapamil or valsopodar, completely restore susceptibility to ivermectin (James and Davey, 2009).

The molecular mechanism by which ABC efflux transporter gene expression are up regulated in ivermectin resistant nematode remain to be determined. Further studies should therefore address the possible link between the putative activation of *nhr-a* and the upregulation of some ABC transporters of interest.

Moreover, it has recently been shown that a wild type copy of *Dyf-7* gene, which is necessary for normal amphid sensory neurons, rescued almost totally ivermectin sensitivity in nematode owning loss of function allele of this gene. Moreover, such mutations have been reported in numerous *H. contortus* strain all over the world, comforting that *Dyf-7* selection is determinant for ivermectin resistance (Urdaneta-Marquez et al., 2014). Combined with our *nhr-a* data, one can speculate that over expression of ABC transporter in resistant strain could be the first barrier for the worm to be protected against ivermectin, but could enhance the selection of *Dyf-7* mutation which is related to be absolutely necessary for ivermectin resistance.

In summary, the present study demonstrates for the first time that (i) *nhr-a* is required for ivermectin susceptibility, (ii) *nhr-a* is partially implicated in ivermectin susceptibility in resistant strain (iii) *nhr-a* is necessary in ivermectin resistance development. These results may have important implications for the conception of new drug targeting nuclear receptor to overcome ivermectin resistance

- Ardelli, B. and R. Prichard, 2008, Effects of Ivermectin and Moxidectin on the Transcription of Genes Coding for Multidrug Resistance Associated Proteins and Behaviour in *Caenorhabditis elegans*, *J Nematol* 40, 290.
- Ardelli, B.F., 2013, Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes, *Parasitol Int* 62, 639.
- Ardelli, B.F. and R.K. Prichard, 2004, Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa, *Ann Trop Med Parasitol* 98, 371.
- Ardelli, B.F. and R.K. Prichard, 2013, Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin, *Vet Parasitol* 191, 264.
- Bartley, D.J., H. McAllister, Y. Bartley, J. Dupuy, C. Menez, M. Alvinerie, F. Jackson and A. Lespine, 2009, P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*, *Parasitology* 136, 1081.
- Berman, J.R. and C. Kenyon, 2006, Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by *kri-1* and lipophilic-hormone signaling, *Cell* 124, 1055.
- Blackhall, W.J., H.Y. Liu, M. Xu, R.K. Prichard and R.N. Beech, 1998, Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*, *Mol Biochem Parasitol* 95, 193.
- Brenner, S., 1974, The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 77, 71.
- Broeks, A., B. Gerrard, R. Allikmets, M. Dean and R.H. Plasterk, 1996, Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*, *Embo J* 15, 6132.
- Broeks, A., H.W. Janssen, J. Calafat and R.H. Plasterk, 1995, A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins, *Embo J* 14, 1858.
- Bygarski, E., R. Prichard and B. Ardelli, 2014, 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* 4, 143.
- Chamoli, M., A. Singh, Y. Malik and A. Mukhopadhyay, 2014, A novel kinase regulates dietary restriction-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*, *Aging Cell* 13, 641.
- Charlier, J., M. van der Voort, F. Kenyon, P. Skuce and J. Vercruyssen, 2014, Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants, *Trends Parasitol*.
- Chen, Y., Y. Tang, C. Guo, J. Wang, D. Boral and D. Nie, 2012, Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters, *Biochem Pharmacol* 83, 1112.
- Choe, K.P., C.K. Leung and M.M. Miyamoto, 2012, Unique structure and regulation of the nematode detoxification gene regulator, SKN-1: implications to understanding and controlling drug resistance, *Drug Metab Rev* 44, 209.
- Chow, E.C., M.R. Durk, C.L. Cummins and K.S. Pang, 2011, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ up-regulates P-glycoprotein via the vitamin D receptor and not farnesoid X

- receptor in both *fxr(-/-)* and *fxr(+/+)* mice and increased renal and brain efflux of digoxin in mice in vivo, *J Pharmacol Exp Ther* 337, 846.
- De Graef, J., J. Demeler, P. Skuce, M. Mitreva, G. Von Samson-Himmelstjerna, J. Vercruyse, E. Claerebout and P. Geldhof, 2013, Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora* isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones, *Parasitology* 140, 499.
- ElAli, A. and D.M. Hermann, 2012, Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells, *Brain Pathol* 22, 175.
- Eng, J.K. and R.K. Prichard, 2005, A comparison of genetic polymorphism in populations of *Onchocerca volvulus* from untreated- and ivermectin-treated patients, *Mol Biochem Parasitol* 142, 193.
- Fisher, A.L. and G.J. Lithgow, 2006, The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *Caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms, *Aging Cell* 5, 127.
- Fitzpatrick, J.L., 2013, Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists, *Vet Parasitol* 195, 233.
- Goudeau, J., S. Bellemin, E. Toselli-Mollereau, M. Shamalnasab, Y. Chen and H. Aguilaniu, 2011, Fatty acid desaturation links germ cell loss to longevity through NHR-80/HNF4 in *C. elegans*, *PLoS Biol* 9, e1000599.
- Harmsen, S., I. Meijerman, R.F. Maas-Bakker, J.H. Beijnen and J.H. Schellens, 2013, PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors, *Eur J Pharm Sci* 48, 644.
- James, C.E. and M.W. Davey, 2009, Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*, *Int J Parasitol* 39, 213.
- Jiang, Y., J. Jin, P. Iakova, J.C. Hernandez, N. Jawanmardi, E. Sullivan, G.L. Guo, N.A. Timchenko and G.J. Darlington, 2013, Farnesoid X receptor directly regulates xenobiotic detoxification genes in the long-lived Little mice, *Mech Ageing Dev* 134, 407.
- Jin, L., X. Feng, H. Rong, Z. Pan, Y. Inaba, L. Qiu, W. Zheng, S. Lin, R. Wang, Z. Wang, S. Wang, H. Liu, S. Li, W. Xie and Y. Li, 2013, The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism, *Nat Commun* 4, 1937.
- Jones, L.M., S.J. Rayson, A.J. Flemming and P.E. Urwin, 2013, Adaptive and Specialised Transcriptional Responses to Xenobiotic Stress in *Caenorhabditis elegans* Are Regulated by Nuclear Hormone Receptors, *PLoS One* 8, e69956.
- Kaplan, R.M. and A.N. Vidyashankar, 2012, An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance, *Vet Parasitol* 186, 70.
- Kaplan, R.M., A.N. Vidyashankar, S.B. Howell, J.M. Neiss, L.H. Williamson and T.H. Terrill, 2007, A novel approach for combining the use of in vitro and in vivo data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats, *Int J Parasitol* 37, 795.

- Kurose, K., M. Saeki, M. Tohkin and R. Hasegawa, 2008, Thyroid hormone receptor mediates human MDR1 gene expression-Identification of the response region essential for gene expression, *Arch Biochem Biophys* 474, 82.
- Laing, S.T., A. Ivens, R. Laing, S. Ravikumar, V. Butler, D.J. Woods and J.S. Gilleard, 2010, Characterization of the xenobiotic response of *Caenorhabditis elegans* to the anthelmintic drug albendazole and the identification of novel drug glucoside metabolites, *Biochem J* 432, 505.
- Lemmen, J., I.E. Tozakidis, P. Bele and H.J. Galla, 2013, Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1 and Abcg2 at the blood-brain barrier after CITCO activation, *Brain Res* 1501, 68.
- Lespine A., M.C., Bourguinat C., Prichard RK., 2012, P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependant anthelmintic resistance, *Int J Parasitol* 2, 58.
- Li, J., A. Ebata, Y. Dong, G. Rizki, T. Iwata and S.S. Lee, 2008, *Caenorhabditis elegans* HCF-1 functions in longevity maintenance as a DAF-16 regulator, *PLoS Biol* 6, e233.
- Lindblom, T.H. and A.K. Dodd, 2006, Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305, 720.
- Lindblom, T.H., G.J. Pierce and A.E. Sluder, 2001, A *C. elegans* orphan nuclear receptor contributes to xenobiotic resistance, *Curr Biol* 11, 864.
- Lloberas, M., L. Alvarez, C. Entrocasso, G. Virkel, M. Ballent, L. Mate, C. Lanusse and A. Lifschitz, 2013, Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3, 20.
- Luo, L., Y.J. Sun, L. Yang, S. Huang and Y.J. Wu, 2013, Avermectin induces P-glycoprotein expression in S2 cells via the calcium/calmodulin/NF-kappaB pathway, *Chem Biol Interact* 203, 430.
- Mahajan-Miklos, S., M.W. Tan, L.G. Rahme and F.M. Ausubel, 1999, Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model, *Cell* 96, 47.
- Ménez, C., L. Mselli-Lakhal, M. Foucaud-Vignault, P. Balaguer, M. Alvinerie and A. Lespine, 2012, Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line, *Biochem Pharmacol* 83, 269.
- Menzel, R., M. Rodel, J. Kulas and C.E. Steinberg, 2005, CYP35: xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Arch Biochem Biophys* 438, 93.
- Motola, D.L., C.L. Cummins, V. Rottiers, K.K. Sharma, T. Li, Y. Li, K. Suino-Powell, H.E. Xu, R.J. Auchus, A. Antebi and D.J. Mangelsdorf, 2006, Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*, *Cell* 124, 1209.
- Pathare, P.P., A. Lin, K.E. Bornfeldt, S. Taubert and M.R. Van Gilst, 2012, Coordinate regulation of lipid metabolism by novel nuclear receptor partnerships, *PLoS Genet* 8, e1002645.

- Pohl, P.C., D.D. Carvalho, S. Daffre, S. Vaz Ida, Jr. and A. Masuda, 2014, In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism, *Vet Parasitol* 204, 316.
- Przybysz, A.J., K.P. Choe, L.J. Roberts and K. Strange, 2009, Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone, *Mech Ageing Dev* 130, 357.
- Qadri, I., M. Iwahashi, G.A. Kullak-Ublick and F.R. Simon, 2006, Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 mediate hepatic multidrug resistance protein 2 up-regulation during hepatitis C virus gene expression, *Mol Pharmacol* 70, 627.
- Rizki, G., T.N. Iwata, J. Li, C.G. Riedel, C.L. Picard, M. Jan, C.T. Murphy and S.S. Lee, 2011, The evolutionarily conserved longevity determinants HCF-1 and SIR-2.1/SIRT1 collaborate to regulate DAF-16/FOXO, *PLoS Genet* 7, e1002235.
- Rizki, G., C.L. Picard, C. Pereyra and S.S. Lee, 2012, Host cell factor 1 inhibits SKN-1 to modulate oxidative stress responses in *Caenorhabditis elegans*, *Aging Cell* 11, 717.
- Robinson-Rechavi, M., C.V. Maina, C.R. Gissendanner, V. Laudet and A. Sluder, 2005, Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes, *J Mol Evol* 60, 577.
- Stejskalova, L., L. Vecerova, L.M. Perez, R. Vrzal, Z. Dvorak, P. Nachtigal and P. Pavek, 2011, Aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon nuclear translocator expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures, *Toxicol Sci* 123, 26.
- Tolson, A.H. and H. Wang, 2010, Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR, *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1238.
- Urdaneta-Marquez, L., S.H. Bae, P. Janukavicius, R. Beech, J. Dent and R. Prichard, 2014, A dyf-7 haplotype causes sensory neuron defects and is associated with macrocyclic lactone resistance worldwide in the nematode parasite *Haemonchus contortus*, *Int J Parasitol*.
- Van Gilst, M., C.R. Gissendanner and A.E. Sluder, 2002, Diversity and function of orphan nuclear receptors in nematodes, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 12, 65.
- Webster, C.M., M.L. Deline and J.L. Watts, 2013, Stress response pathways protect germ cells from omega-6 polyunsaturated fatty acid-mediated toxicity in *Caenorhabditis elegans*, *Dev Biol* 373, 14.
- Wu, W. and P.T. LoVerde, 2011, Nuclear hormone receptors in parasitic helminths, *Mol Cell Endocrinol* 334, 56.
- Yan, R., L. Urdaneta-Marquez, K. Keller, C.E. James, M.W. Davey and R.K. Prichard, 2012, The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*, *Vet Parasitol* 190, 519.

PARTIE 2

La deuxième partie de la thèse a concerné la recherche de stratégies pour potentialiser l'efficacité de l'ivermectine.

La surexpression des transporteurs ABC d'efflux, et notamment d'ABCB1 chez le mammifère (**Chapitre 1**), ou de ces homologues chez les parasites, est clairement associée à une baisse d'efficacité de l'agent thérapeutique substrat. C'est le cas pour l'ivermectine. Différentes méthodes ont été développées pour palier cette restriction d'efficacité anthelminthique. Parmi elles, l'inhibition des transporteurs impliqués dans le phénotype MDR est pertinente pour augmenter l'efficacité des LMs dans le contexte du développement massif des résistances aux anthelminthiques. En effet, le blocage de l'efflux du médicament par l'utilisation d'agents pharmacologiques inhibiteurs des transporteurs concernés, permet d'augmenter la concentration de la drogue au sein de l'organisme. Plusieurs inhibiteurs ont été décrits, mais ils ne peuvent être proposés comme agent thérapeutique à cause de leur toxicité avérée. Il est nécessaire et urgent de trouver de nouveaux inhibiteurs efficaces et sans toxicité pour l'hôte.

Cette partie est constituée de deux chapitres. Le premier évalue les capacités de composants alimentaires naturels, les flavonoïdes à potentialiser l'efficacité de l'ivermectine (**Chapitre 4**). Les résultats montrent que certains flavonoïdes, comme la phlorétine et le kaempferol, potentialisent l'efficacité de l'ivermectine chez une lignée de *C. elegans* résistante à l'ivermectine. Le second concerne l'étude d'un dérivé de l'ivermectine, l'ivermectine aglycone (**Chapitre 5**), qui potentialise l'efficacité de l'ivermectine chez un isolat de *T. circumcincta* résistant à l'ivermectine.

General introduction

Infections with gastrointestinal nematodes (GINs) are a worldwide animal health problem that occurs in grazing ruminants and cattle. The production losses combined with the cost of the control measure undermine economical viability of livestock industries (Charlier et al., 2014; Fitzpatrick, 2013). The principal control of GINs in livestock is currently achieved by the use of macrocyclic lactones (MLs), such as ivermectin. These molecules are efficient against a broad spectrum of parasite including benzimidazole resistant nematodes, and they are highly safe. Ivermectin is the pioneering worldwide anthelmintic agent used for the last 30 years. Nevertheless, extensive use of ivermectin has led to a decrease in the drug efficacy and nowadays, worldwide ivermectin resistance compromises the control of GINs in livestock (Kaplan and Vidyashankar, 2012). Therefore, finding strategies aiming at optimizing the control of GINs relies in limiting the development of anthelmintic resistance and is nowadays a key issue in research and agriculture.

Over-expression of ABC transporters is often associated with ivermectin resistance in nematodes and it is speculate that the increase of the drug efflux from the target cells contributes to decrease drug efficacy (Ardelli, 2013; Lespine A., 2012). As an example, the *C. elegans* strain resistant to ivermectin shows inducible increase of *abcb-1*, *abcb-2*, *abcc-1* and *abcc-2* (James and Davey, 2009). Moreover, increase in expression levels of ABC transporters genes have been observed in numerous parasitic nematode species resistant to ivermectin such as *H. contortus*, *T. circumcincta*, *C. oncophora* and *P. equorum* (De Graef et al., 2013; Lloberas et al., 2013; Williamson et al., 2011).

Multidrug ABC transporters including P-glycoproteins (ABCBs) and ABCG2 are membrane proteins widely expressed at all the main barrier of an organism. They pump actively xenobiotics out of the cell by the use of the energy emerging from the hydrolysis of ATP leading to decrease substrate concentration into the cell. They limit therefore entrance of exogenous compounds and protect the organism against their toxicity.

One strategy proposed to increase drug efficacy is the use of inhibitor of ABC transporters that should impact on the concentration of the drugs inside the target. The objectives of this chapter were to study the capacity of both flavonoids which are natural compounds and a ML derivative named ivermectin aglycone, to potentiate ivermectin efficacy in ivermectin resistant nematodes.

CHAPITRE 4

**EFFETS DES FLAVONOÏDES SUR L'EFFICACITE DE
L'IVERMECTINE CHEZ *C. ELEGANS***

Impact of flavonoids on ivermectin efficacy in ivermectin resistant and susceptible *C. elegans* – possible role of ABC-transporters

1. Introduction

The interest in plant as pharmacological active agents to control helminth parasite has resurged in recent years (Hoste et al., 2006). Indeed, some bioactive plants, especially tannin-rich plants, represent a valuable alternative to control gastro intestinal nematodes (GIN) (Zhong et al., 2014). Several studies have reported that grazing on tannin-containing plants can reduce GIN infections in ruminants, with tannins, which are polyphenols, being the effective bioactive compounds (Gujja et al., 2013). Condensed tannins and flavonoids, also called secondary metabolites, have been shown to have anthelmintic activity by changing the cuticle structure of the parasite or by inhibiting the exsheathment of the third-stage larvae (Hoste et al., 2006; Hoste et al., 2012). Moreover, flavonoids interact strongly with mammalian ABC transporters. As example, quercetin restores drug efficacy in numerous drug resistant cells over-expressing ABCB1, ABCG2 or ABCC1 (Chen et al., 2010). Consequently, flavonoids have been proposed in cancer to reverse the MDR phenotype caused by the over-expression of ABC transporters (Bansal et al., 2009; Ravishankar et al., 2013). Given that ivermectin is a strong inhibitor of these transporters, one can expect interaction between this drug and flavonoids when chemotherapy is performed in animals fed tannin-rich diet. Therefore, flavonoids could represent potential candidates to improve ivermectin availability and efficacy in nematode, especially in resistant strains with over-expression of ABC transporters.

The objectives of this study were first to determine the ability of five flavonoids (Figure 1), phloretin, kaempferol, quercetin, rutin and catechin, to inhibit human ABC transporters of interest, ABCB1 and ABCG2. We have then studied the impact of these flavonoids on the development of susceptible and ivermectin resistant strains of *C.elegans*. Finally, the effect of the flavonoids on ivermectin efficacy was evaluated in both susceptible and resistant strains of *C.elegans*.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

Valspodar (VSP) was a generous gift from Novartis (Basel, Switzerland). Calceine-AM, dimethylsulfoxide (DMSO), Hoescht 33342, ivermectin (IVM), oxfendazole (OXF) and TritonTM-X100 were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS), glutamine, penicillin-streptomycin solution (10,000 units/ml penicillin and 10,000 µg/ml of streptomycin) and trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA) were obtained from Invitrogen - Life Technologies (Cergy Pontoise, France). Other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

2.2 Cell cultures

MDCKII, Madine-Darby Canine kidney epithelial cell lines, MDCKII-ABCB1 and MDCKII-ABCG2 which are recombinant MDCKII over expressing human *ABCB1* gene and human *ABCG2* gene, respectively, were used (kindly provided by Pr A Schinkel, Netherland). Cells were maintained in 5% CO₂ and 95% humidity at 37°C and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. Cells were then trypsinized and seeded on 96-well plates at 5 x 10⁴ cells until confluence for transport activity assay and for protein quantification.

2.3 ABCB1 and ABCG2 transport activity assay

Cells were cultured with Calcein-AM at 10 µM during two hours with or without valsopodar (Valspodar, 10 µM), (MDCKII-ABCB1) or 10 µM of hoescht 33342 with or without oxfendazole (OXF, 5 µM) MDCKII-ABCG2). For studying the effect of flavonoids, cells were culture in presence of increasing concentration (1-100 µM) of catechin, or kaempferol or phloretin, or quercetin, or rutin. All drugs were dissolved in DMSO and diluted in the medium (final concentration of DMSO = 0.1%). After 2-h incubation period, the cells were washed twice with HBSS and lysed in distilled water/0.5 % SDS/ 1 % Triton-X100. To study transporter activities of human ABCB1 and ABCG2, the intracellular accumulation of fluorecence was measured in the cell lysates with an automatic Infinite M 2000 microplate reader (Tecan, Austria) : calcein at λ_{\max} excitation = 507 nm; λ_{\max} emission = 529 nm, and Hoescht at λ_{\max} excitation = 355 nm; λ_{\max} emission = 465 nm. Fluorescence arbitrary units were normalized to cellular protein content per well. Cellular protein content was determined with BCA kit using bovine serum albumin as protein standard (Smith et al., 1985). Results were expressed as the percent of intracellular accumulation of fluorescence in comparison with control (100 % value).

2.4 *Caenorhabditis elegans* culture

Nematodes used were wild-type N2 Bristol originally obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (funded by the NIH National Center for Research Resource, USA) and IVR10 strain. IVR10 have been obtained under drug selection pressure on increasing concentration of ivermectin (James and Davey, 2009). They are phenotypically resistant to 10 ng/ml of ivermectin (kindly provided by Dr C. E. James). All strains were maintained on nematode growth medium (NGM) plates seeded with *Escherichia coli* OP50 at 21°C as described previously (Brenner, 1974). For IVR10, 10 ng/ml of ivermectin was added to agar plate. Synchronous population was obtained by washing off the plate into centrifuge tubes, asynchronous population with majority of gravid adults. All larval stages except eggs were lysed with a bleaching mixture. Three washes of M9 were done to retire the toxic bleaching mixture. Synchronous L1 were obtained from eggs after agitating overnight into M9 buffer without OP50 at 21°C.

2.5 Larval development assays (LDA)

Larval development assay were performed from L1-larval stage in 12-well sterile NGM plate that had been seeded with OP50. Plates used in the assay were freshly prepared for each experiment in 12- well plates. 24 hours after the plates had been poured, 15 µl of *Escherichia coli* OP50 fresh culture was spread and incubated at room temperature for 72 hours until L1 larvae were spread. Synchronous L1 larvae were transferred to the plate (20-30 per well) and were allowed to grow at 21°C until young adult stage. For each condition, only animals reaching the adult stage were scored. The effect of flavonoids on LDA was studied by performing the LDA on 12-well plates in presence of increasing concentrations of one flavonoid (0-800 µM). Similarly, ivermectin effect was assessed by adding drug at concentration ranging from 0 to 8 ng/ml (0 to 9.1 nM) for N2 Bristol and from 0 to 24 ng/ml (0 to 27.4 nM) for IVR10. The interfering effect of flavonoids on ivermectin efficacy was determined in the presence of increasing concentrations of ivermectin and with or without flavonoid at 100 µM in NGM. For each condition, only animals reaching the adult stage were scored.

2.6 Statistical analysis

The curve fitting for calcein

, hoescht accumulation and for larval development assay was performed with GraphPad Prism 4 Software (GraphPad, SanDiego, CA, USA. Statistical analysis were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tuckey post-test to compare the effect of ivermectin over control, while individual comparisons between pairs of data were performed

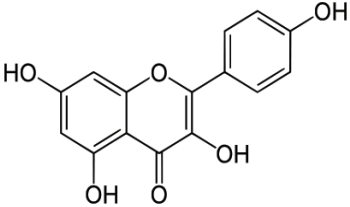
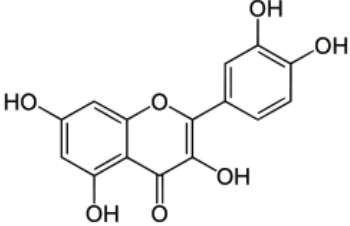
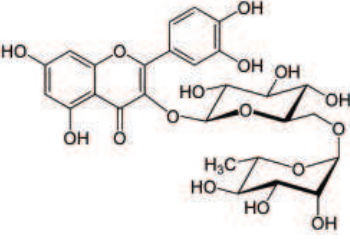
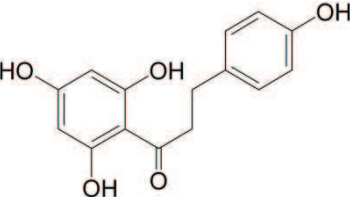
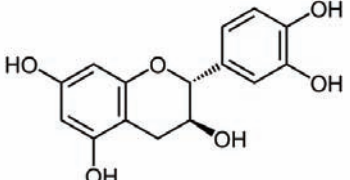
using the Mann-Whitney test (GraphPad Instat, San Diego, CA, USA). Data are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). Statistical significance was accepted as $P < 0.05$.

3 Results

3.1 Influence of flavonoids on efflux activity in MDCK cells over expressing human ABCB1 or human ABCG2.

We first explored the capacity of flavonoids to modulate transport activity of human ABCB1 and ABCG2, *in vitro*. Five flavonoids were tested, catechin, kaempferol, phloretin, quercetin and rutin, based on their presence in tannin-rich diet and on their structural feature (Table 1)

Table 1 : Structure of flavonoids

Group	Structure	Molecule
Flavonol		Kaempferol
		Quercetin
		Rutin
Dihydrochalcone		Phloretin
Flavanol		Catechin

Two different MDCKII cell lines over-expressing selectively ABCB1 or ABCBG2 were used. In parental MDCKII, the accumulation of the fluorescent calcein, the typical ABCB1 substrate, was significantly lower (50 %) in cells over expressing ABCB1. Similarly, the intracellular amount of hoescht, the typical ABCG2 substrate, was 30 % lower in cells over expressing ABCG2 compared with parental MDCKII (data not shown). The impacts of catechin, kaempferol, phloretin, quercetin and rutin on activity of ABCB1 and ABCG2 are presented in Figure 1. The curve shape clearly reveals that kaempferol, quercetin and to a lower extent phloretin, increase intracellular fluorescence in a dose-dependant manner in cells over-expressing ABCB1. This means that these 3 compounds can inhibit the ABCB1-mediated efflux of calcein (Fig 1A). In addition, kaempferol and phloretin inhibit ABCG2-mediated efflux in cells over expressing ABCG2. Catechin and rutin failed to alter the intracellular accumulation of calcein and hoescht in ABCB1 and ABCG2 over expressing cells, respectively.

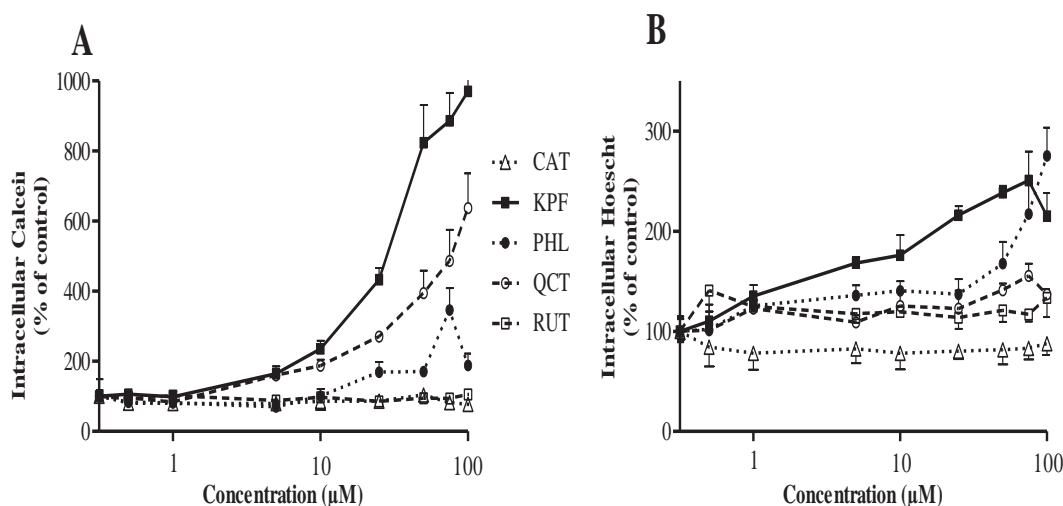


Figure 1. Influence of flavonoids on intracellular accumulation of calcein in MDCK-ABCB1 cells (A) and on intracellular accumulation of Hoescht in MDCK-ABCG2 cells (B). Cells were incubated with 10 μM of Calcein-AM (1 μM), or Hoescht (10 μM), with catechin (CAT), or kaempferol (KPF), or phloretin (PHL), or quercetin (QCT), or rutin (RUT) for 2 h at 37 °C. Data are mean ± S.D. of three wells for each compound.

The maximal intracellular accumulation of fluorophore (Max_{flu0}) and the concentration needed for half effect are listed in Table 1.

Table 2. Influence of flavonoids on ABCB1 transport activity in MDCK-ABCB1 cells and on ABCG2 transport activity in MDCK-ABCG2 cells.

	MDCK-ABCB1		MDCK-ABCG2	
	Max_{flu0} (%)	half-effect (μ M)	Max_{flu0} (%)	half-effect (μ M)
Reference ABCB1				
Valspodar	100		–	–
Reference ABCG2				
Oxfendazole	–	–	100	
Flavonoids				
Quercetin	45	70.3	72.4	15.9
Phloretin	11.8	23.1	143.5	65.1
Kaempferol	52.7	30.4	130.9	5.2
Catechin	–	–	–	–
Rutin	–	–	–	–

Max_{flu0} is the maximal intracellular accumulation of fluorophore, in our conditions, in cells expressed as the percent of the 100 % inhibition from ABCB1 and ABCG2 inhibitors (valsopodar and oxfendazole, respectively). Half-effect value is the concentration needed for half-maximal effect. Max_{flu0} data are mean \pm S.D. of three experimental points. Half-effect is the single value from the mean curve of three experimental points from Fig. 1

In our conditions, in MDCK-ABCB1, the maximal effect for phloretin was 11.8 % of control value. For quercetin and kaempferol, Max_{flu0} values were much higher (45 % and 52.7 %, respectively). The concentration needed to have half effect were 23.1 μ M, 30.4 μ M and 70.3 μ M for phloretin, kaempferol and quercetin, respectively.

For MDCK-ABCG2, the maximal effect was 72.4 % for quercetin and higher with phloretin and kaempferol (143.5 % and 130.9 %, respectively). For quercetin and phloretin, half effect values were 15.9 μ M and 65.1 μ M, respectively. For kaempferol, the EC_{50} was much lower (5.2 μ M).

3.2 Influence of flavonoids on the development of *C.elegans*.

The aim of these studies was to determine sub toxic concentrations of flavonoids in *C.elegans* when added alone using larval development assay (LDA). Data are presented in Figure 2.

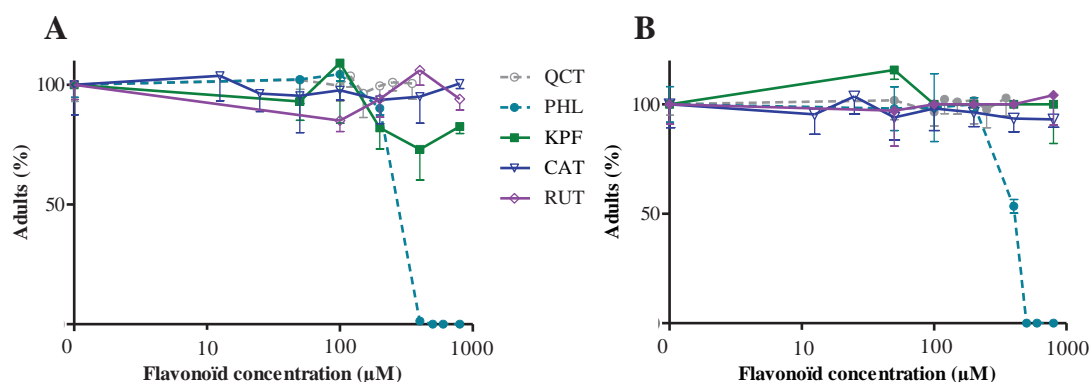


Figure 2. Influence of flavonoids on the larval development of *C. elegans* N2 Bristol strain (A) and in *C.elegans* IVR10 strain (B). *C. elegans* were incubated with 100 μM of quercetin (QCT), or phloretin (PHL) or kaempferol (KPF), or catechin (CAT) or rutin (RUT) for 43 h at 20 °C. Data are mean ± S.D. compared with control.

This assay was conducted on two different strains: the parental N2 Bristol strain (Fig. 2A) and IVR10 (Fig. 2B) resistant to 10 ng/ml of ivermectin. In both strains, quercetin, kaempferol, catechin and rutin did not affect the development of *C.elegans* up to a concentration of 800 μM. Phloretin was the only flavonoid that showed an impact on the development of both strains with an EC₅₀ of 240 μM in N2 Bristol and of 400 μM in IVR10.

3.3 Impact of flavonoids on ivermectin susceptibility in *C.elegans*.

We tested the ability of flavonoids to modulate ivermectin efficacy *in vitro* in N2 Bristol and IVR10 *C.elegans* strains. *C.elegans* were exposed during all development period with increasing concentrations of ivermectin alone or combined with a fixed concentration (100 μM) of each flavonoid.

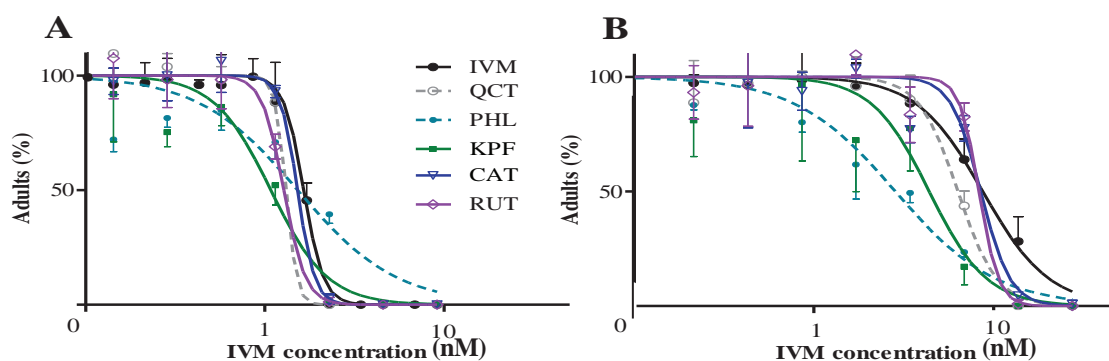


Figure 3. Influence of flavonoids on susceptibility to ivermectin in *C. elegans* N2 Bristol strain (A) and in *C. elegans* IVR10 strain (B). *C. elegans* were incubated with ivermectin alone (IVM), or with ivermectin combined with 100 μ M of quercetin (QCT), or phloretin (PHL) or kaempferol (KPF), or catechin (CAT) or rutin (RUT) for 43 h at 20°C. Data are mean \pm S.D. compared with control.

The EC₅₀ calculated from the curve in Figure 3 and the resistance Factor (RF) are listed in Table 3.

Table 3. Influence of flavonoids on sensitivity to ivermectin in *C. elegans* N2 Bristol and IVR10 strains

	EC ₅₀ (nM)		Resistance Factor (RF)
	N2 Bristol	IVR10	
Ivermectin alone	1.6	8.7	5.4
IVM + Quercetin	1.3	6.3	3.9
IVM + Phloretin	1.5	2.8	1.8
IVM + Kaempferol	1.1	4.4	2.8
IVM + Catechin	1.5	8.5	5.3
IVM + Rutin	1.3	8.3	5.2

EC₅₀ is the concentration needed for half development of *C. elegans* in adults. EC₅₀ is the single value calculated from the mean curve of three experimental points calculated from Fig. 2. Resistance Factor (RF) corresponds to the ratio of EC₅₀ in IVR10 strain to EC₅₀ in N2 Bristol strain.

The EC₅₀ of ivermectin alone on N2 Bristol was 1.6 nM. As expected, in IVR10 strain the EC₅₀ value was higher (8.7 nM) confirming the resistance to ivermectin (RF = 5.4). None of

the flavonoids tested had an effect on the efficacy of ivermectin in the control strain N2 Bristol. Similarly, catechin and rutin did not impact the efficacy of ivermectin in IVR10 strain. In this strain, the calculated EC_{50} was lower when ivermectin was combined with quercetin (6.3 nM) causing a slight decreased of RF (3.9). Kaempferol and phloretin also decreased the EC_{50} value of ivermectin to 4.4 nM and 2.8 nM, respectively. The RF of IVR10 was subsequently markedly decreased to 2.8 by kaempferol and 1.8 by phloretin. Indeed, phloretin and kaempferol increase ivermectin efficacy and they were able to reverse about 67 % and 48 % the resistance of IVR10 to ivermectin, respectively.

4 Discussion

The widespread resistance to ivermectin and the slow discovery process of new anthelmintics impose to find alternative strategy for sustainable helminth control. Given that over-expression of multidrug transporters certainly participates to the occurrence of resistance in parasite nematodes by preventing the drug from reaching the target (Lespine A., 2012), these transporters represent relevant target to inhibit. Therefore, compounds able to inhibit drug efflux can be proposed for potential clinical use in macrocyclic lactone resistance reversal.

Given the use of flavonoid-rich forages as an alternative to anthelmintic drugs, and the possible association with drugs, we have explored the interaction of five flavonoids quercetin, phloretin, kaempferol, catechin and rutin with human ABCB1 and ABCG2. In mammalian cells, quercetin, phloretin and kaempferol treatments inhibit ABCB1 and ABCG2 transport activity in a dose dependant manner. Kaempferol was clearly the most potent and efficient inhibitor of both ABCB1 and ABCG2 when compared with phloretin and quercetin. Our results are in agreement with previous report showing that kaempferol is both a potent substrate and inhibitor of ABCB1 (Limtrakul et al., 2005) and ABCG2 (An et al., 2011). Nevertheless, phloretin and quercetin were also shown to inhibit these transporters in other systems (Jaeger, 2009; Limtrakul et al., 2005; Morris and Zhang, 2006) but they were both less potent and efficient than kaempferol. Interestingly, catechin and rutin failed to alter ABCB1 and ABCG2 transport activity. This is in accordance with other studies showing that catechin was unable to inhibit ABCB1-mediated transport and consistent with the fact that the inhibitory effect on ABCB1 of flavonoids was enhanced with the presence of galloyl moiety, which is lacking in catechin (Kitagawa et al., 2004). Otherwise, catechin has been shown to be transported by ABCG2 (Sesink et al., 2005) but the effect of catechin on ABCG2-mediated transport has not been reported so far. Likewise, rutin was found to be a substrate of ABCB1 (Zhang et al., 2013) but not of ABCG2. It has been speculates that the attachment of a sugar moiety may markedly attenuate or totally abolish inhibitory transporter activity of the flavonoid (Zhang et al., 2004). The presence of rutinose sugar on rutin is in accordance with the low inhibitory action of rutin on ABCB1. Nevertheless, one recent publication has demonstrated that rutin could be an inhibitor of ABCB1 *in vivo* (Kumar et al., 2014). However, inhibiting mammalian ABC transporters when ivermectin is administered can improve ivermectin neurotoxic effect as this drug is a substrate of ABCB1 which is well expressed at the blood brain barrier. In that respect, results exposed in this study, combined with same data in progress, in collaboration with the institute of parasitology at McGill University, on mammalian cells over expressing nematode ABCB, could be a strong strategy

to find specific inhibitor of nematode ABC transporter. Such combined results could allow us to avoid any toxic effect of ivermectin of the host.

All together, our results suggest that kaempferol, phloretin and quercetin could modulate bioavailability of ABCB1 and ABCG2 substrates in mammals. Thus, when administered simultaneously with ivermectin, they may affect drug kinetic and efficacy.

The anthelmintic properties of flavonoids have been shown by their effects on motility and on cuticule of parasite (Hoste et al., 2006; Hoste et al., 2012). The question was whether they have an effect on the development of the worm. We have evaluated the impact of flavonoids on the development of parental *C.elegans* and in the ivermectin resistant strain IVR10. Interestingly, rutin, kaempferol and quercetin did not affect the development in the 2 strains of *C. elegans*. Phloretin was able to block the development at high concentrations in both strains. Interestingly, phloretin was less potent in ivermectin resistant strain suggesting that this strain is tolerant not only to ivermectin but also to phloretin. Knowing that phloretin is a substrate of ABC mammalian transporters and that a main difference between this 2 strains is the over-expression of most ABC transporters, one can assume that this higher tolerance to phloretin is due to ABC transporter over-expression.

One strategy proposed to reverse resistance is the use of inhibitor of ABC transporters as they may increase drug efficacy through their impact on drug concentration. We have evaluated the capacity of these flavonoids to potentiate ivermectin efficacy in both strains of *C. elegans*. As expected, IVR10 *C.elegans* strain required higher ivermectin concentration to alter larval development than parental strain, in agreement with previous data using viability assay (James and Davey, 2009). We showed that phloretin clearly increased ivermectin efficacy in IVR10 strain. Kaempferol was also shown do diminish the resistance factor of this strain but moderately. Previous report have shown that ABCB1 inhibitors such as valspodar, verapamil and quercetin combined with ivermectin enhanced ivermectin efficacy in sensitive isolates and also in resistant *H. contortus* and *T. circumcincta* nematodes (Bartley et al., 2009). Given that phloretin and kaempferol are mammalian ABC transporters inhibitors, our data suggest that they may inhibit nematode transporters that are over-expressed in IVR10 strain. All the other flavonoids tested did not have any effect on larval development. Nevertheless, we observed that the reversal effect was not maximal, so one can assume that other factors could be implicated in the drug resistance phenotype. Nothing is known about the interaction of ivermectin or flavonoids with homologues of ABC transporters in nematodes. Further analysis, with new tools, such as cells over-expressing ABC transporters specific of parasitic nematode, which are in progress in the collaborating laboratory of McGill, could be a strong

support to investigate the affinity of each flavonoids and of anthelmintic macrocyclic lactones.

The molecular mechanisms by which ABC transporters are over-expressed in nematodes resistant to ivermectin remain to be determined. In mammals, ABC transporters are mainly regulated at transcriptional level by nuclear receptors which have the particularity to bind endogenous or exogenous compounds. Recent review reports that flavonoids can interact with nuclear receptors and lead to the modulation of nuclear receptor target gene (Avior et al., 2013). As in nematodes, there is lot of homologous of nuclear receptor, one can speculate that flavonoid could interact directly with such nuclear receptor and inhibit over-expression of ABC transporters in resistant nematodes. Further research should therefore address the possible link between the interaction of nuclear receptor with flavonoids and the reversal effect on ivermectin resistance herein presented. Moreover, further analysis studying target gene expression of nuclear receptor and ABC efflux transporters on resistant strain growing with flavonoid should be useful to investigate this hypothesis.

In conclusion, this study demonstrates that some flavonoids are able to increase susceptibility to ivermectin in resistant *C.elegans* by interacting with ABC transporters. These results suggest that ivermectin could be more active when animals were fed flavonoids-rich plants. An *in vivo* study is required to address this aspect.

- An, G., J. Gallegos and M.E. Morris, 2011, The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux, *Drug Metab Dispos* 39, 426.
- Ardelli, B.F., 2013, Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes, *Parasitol Int* 62, 639.
- Avior, Y., D. Bomze, O. Ramon and Y. Nahmias, 2013, Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity, *Food Funct* 4, 831.
- Bansal, T., M. Jaggi, R.K. Khar and S. Talegaonkar, 2009, Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy, *J Pharm Pharm Sci* 12, 46.
- Bartley, D.J., H. McAllister, Y. Bartley, J. Dupuy, C. Menez, M. Alvinerie, F. Jackson and A. Lespine, 2009, P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*, *Parasitology* 136, 1081.
- Brenner, S., 1974, The genetics of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 77, 71.
- Charlier, J., M. van der Voort, F. Kenyon, P. Skuce and J. Vercruysse, 2014, Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants, *Trends Parasitol*.
- Chen, C., J. Zhou and C. Ji, 2010, Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance, *Life Sci* 87, 333.
- De Graef, J., J. Demeler, P. Skuce, M. Mitreva, G. Von Samson-Himmelstjerna, J. Vercruysse, E. Claerebout and P. Geldhof, 2013, Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora* isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones, *Parasitology* 140, 499.
- Fitzpatrick, J.L., 2013, Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists, *Vet Parasitol* 195, 233.
- Gujja, S., T.H. Terrill, J.A. Mosjidis, J.E. Miller, A. Mechineni, D.S. Kommuru, S.A. Shaik, B.D. Lambert, N.M. Cherry and J.M. Burke, 2013, Effect of supplemental sericea lespedeza leaf meal pellets on gastrointestinal nematode infection in grazing goats, *Vet Parasitol* 191, 51.
- Hoste, H., F. Jackson, S. Athanasiadou, S.M. Thamsborg and S.O. Hoskin, 2006, The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants, *Trends Parasitol* 22, 253.
- Hoste, H., C. Martinez-Ortiz-De-Montellano, F. Manolaraki, S. Brunet, N. Ojeda-Robertos, I. Fourquaux, J.F. Torres-Acosta and C.A. Sandoval-Castro, 2012, Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections, *Vet Parasitol* 186, 18.
- Jaeger, W., 2009, Classical resistance mechanisms, *Int J Clin Pharmacol Ther* 47, 46.
- James, C.E. and M.W. Davey, 2009, Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*, *Int J Parasitol* 39, 213.
- Kaplan, R.M. and A.N. Vidyashankar, 2012, An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance, *Vet Parasitol* 186, 70.
- Kitagawa, S., T. Nabekura and S. Kamiyama, 2004, Inhibition of P-glycoprotein function by tea catechins in KB-C2 cells, *J Pharm Pharmacol* 56, 1001.

- Kumar, K.K., L. Priyanka, K. Gnananath, P.R. Babu and S. Sujatha, 2014, Pharmacokinetic drug interactions between apigenin, rutin and paclitaxel mediated by P-glycoprotein in rats, *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*.
- Lespine A., M.C., Bourguinat C., Prichard RK., 2012, P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependant anthelmintic resistance, *Int J Parasitol* 2, 58.
- Limtrakul, P., O. Khantamat and K. Pintha, 2005, Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin, *J Chemother* 17, 86.
- Lloberas, M., L. Alvarez, C. Entrocasso, G. Virkel, M. Ballent, L. Mate, C. Lanusse and A. Lifschitz, 2013, Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3, 20.
- Morris, M.E. and S. Zhang, 2006, Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters, *Life Sci* 78, 2116.
- Ravishankar, D., A.K. Rajora, F. Greco and H.M. Osborn, 2013, Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy, *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2821.
- Sesink, A.L., I.C. Arts, V.C. de Boer, P. Breedveld, J.H. Schellens, P.C. Hollman and F.G. Russel, 2005, Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides, *Mol Pharmacol* 67, 1999.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson and D.C. Klenk, 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* 150, 76.
- Williamson, S.M., B. Storey, S. Howell, K.M. Harper, R.M. Kaplan and A.J. Wolstenholme, 2011, Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*, *Mol Biochem Parasitol* 180, 99.
- Zhang, S., X. Yang and M.E. Morris, 2004, Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport, *Mol Pharmacol* 65, 1208.
- Zhang, X., J. Song, X. Shi, S. Miao, Y. Li and A. Wen, 2013, Absorption and metabolism characteristics of rutin in Caco-2 cells, *ScientificWorldJournal* 2013, 382350.
- Zhong, R.Z., H.Y. Li, H.X. Sun and D.W. Zhou, 2014, Effects of supplementation with dietary green tea polyphenols on parasite resistance and acute phase protein response to *Haemonchus contortus* infection in lambs, *Vet Parasitol* 205, 199.

CHAPITRE 5

**EFFETS DE L'IVERMECTINE AGLYCONE SUR L'EFFICACITE DE
L'IVERMECTINE CHEZ *T. CIRCUMCINCTA***

Use of ivermectin aglycone to increase efficacy of ivermectin in *T. circumcincta* ivermectin resistant strain

1 Introduction

Ivermectin and other structurally related MLs, have been shown to be potent inhibitors of ABC efflux transporters and they have been proposed as reversal agent or polychemoresistance (Pouliot et al., 1997). Such inhibitors are not safe as they can have neurotoxic effects in mammals. Indeed, ivermectin hypersensitivity with neurotoxicity was observed in ABCB1 deficient mice (Schinkel et al., 1994), and both in a subpopulation CF1 mice (Kwei et al., 1999) and in Collie dog (Roulet et al., 2003) where it was also associated with a mutation in ABCB1 gene. Many ML derivatives have been generated and tested for their anthelmintic activity. Among them, ivermectin aglycone was excluded because it showed low efficacy in several nematode species of interest (Shoop et al., 1995). However, ivermectin aglycone is structurally related to ivermectin and therefore it may have the ability to inhibit ABC transporter. This hypothesis has been tested in the laboratory and it has been shown that ivermectin aglycone (i) inhibits ABCB1 transport activity in cells overexpressing human or murine ABCB1, (ii) restores sensitivity in vinblastin-resistant cells over expressing ABCB1 when co-administered with the drug (iii) has low affinity for mammalian GABA receptor and it has no observable neurotoxicity in ABCB1-deficient mice. In our context, we have studied the effect of ivermectin aglycone on the feeding behavior of nematodes. We have used ivermectin resistant isolate of *T. circumcincta* already used to test inhibitor by such test (Bartley et al., 2009) and characterized for the expression of its ABC transporter (Dicker et al., 2011). For this I have gone, during 2 weeks, to the Moredun institute laboratory in Scotland where the larval feeding inhibition test is currently used. This collaboration allowed me to develop this assay in the Toxalim laboratory in Toulouse.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Valspodar (VSP) was a generous gift from Novartis (Basel, Switzerland), Dimethylsulfoxide (DMSO), ivermectin (IVM) were purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France). Ivermectin aglycone was produced in our laboratory.

2.2 Nematode isolate

Susceptible and resistant nematode strains of *T. circumcincta* were kindly donated by the Moredun Research Institute (MRI, Edinburgh, Scotland, UK). All the isolates were routinely maintained by passage through lambs according to the standard procedures. Animals were housed within MRI and following its Animal Welfare Committee recommendations. The housed conditions precluded contamination with other nematode species prior to use. Two *T. circumcincta* MTci3 and MTci4 phenotypically ivermectin sensitive and resistant, respectively, were used in this assay (Jackson et al., 1992).

2.3 Recovery and cleaning of eggs

Nematode ova from faeces of monospecifically infected animals were extracted as described previously (Bartley et al., 2003). Briefly, eggs were retained, from anaerobic faecal samples, on a 38 µm sieve. Then, they were floated in saturated sodium chloride solution and centrifuged at 200 x g for 2 minutes. The floating eggs were removed, washed profusely with tap water and resuspended in a 10 cm Petri dish prior to being incubated for 16 h at 22°C.

2.4 Egg hatching and L1 recovery

After the incubation period, mature eggs were placed in a mini-Baermann apparatus (mesh aperture 25 µm) on a 6-well cluster plate, submerged in water and incubated at 22°C for approximately 4 hours. Following the incubation period, the first-stage larvae (L1) migrated through the mesh. For each conditions tested with LFIT, 100 larvae in 1498 µl of water in a 2 ml microcentrifuge tubes were prepared in triplicate.

2.5 Larval Feeding Inhibition Test (LFIT)

This test was previously described (Bartley et al., 2009). Briefly, the microcentrifuge tubes, containing larvae in presence of each molecules, were incubated horizontally at 25°C for 2

hours. To study the capacity of ivermectin aglycone and valsopodar to potentiate ivermectin efficacy, ivermectin aglycone (13 nM) or valsopodar (5 μ M) were added to tubes containing ivermectin. After this incubation period, 10 μ l of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled *Escherichia coli* (Geary et al., 1993) were added. The tubes were then incubated horizontally for approximately 18 hours at 25°C. They were centrifuged at 3000 x g for 20 sec and 750 μ l of supernatant was removed. One wash with tap water was done. Larvae were transferred onto a glass slide for counting and were examined at a magnification of x 100 using an inverted fluorescence microscope with a UV blue range filter (495 nm). Larvae with FITC-labelled *E.coli* visible through the gastrointestinal tract were considered to be feeding.

To study ivermectin aglycone toxicity, larvae were incubated with ivermectin aglycone alone in a concentration range from 0 to 6700 nM.

To study the potential effect of valsopodar and ivermectin-aglycone to potentiate ivermectin efficacy, LFIT were performed by adding to larvae, ivermectin in a range of 1-125 ng/ml (1.5-190.5 nM) while valsopodar and ivermectin aglycone concentrations were fixed at 5 μ M and 13 nM, respectively. Control assays were performed with DMSO or Valsopodar or ivermectin - aglycone alone.

The final results were expressed as the percent of feeding larvae in presence of ivermectin alone or ivermectin combined with VSP or ivermectin aglycone, in comparison with control (DMSO, 100 % value).

2.6 Statistical analysis

The curve fitting for LFIT was performed by GraphPad Prism 4 Software (GraphPad, San Diego, CA, USA) and allowed to calculate EC₅₀ values. Statistical analysis of variance (ANOVA) was performed with a Tukey post-test to compare the combined effect of valsopodar or ivermectin aglycone with ivermectin over ivermectin alone (GraphPad Instat, San Diego, CA, USA). Data are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). Statistical significance was accepted as $P < 0.05$.

3 Results

Effect of valsopodar and ivermectin aglycone on feeding behaviour of *Teladorsagia circumcincta* ivermectin resistant strain

We have first studied the toxic effect of ivermectin aglycone alone in a concentration range from 13 to 6700 nM on both susceptible and resistant *T. circumcincta* strains. The effects of ivermectin aglycone alone on the feeding behaviour of both *T. circumcincta* strains are shown Figure 1.

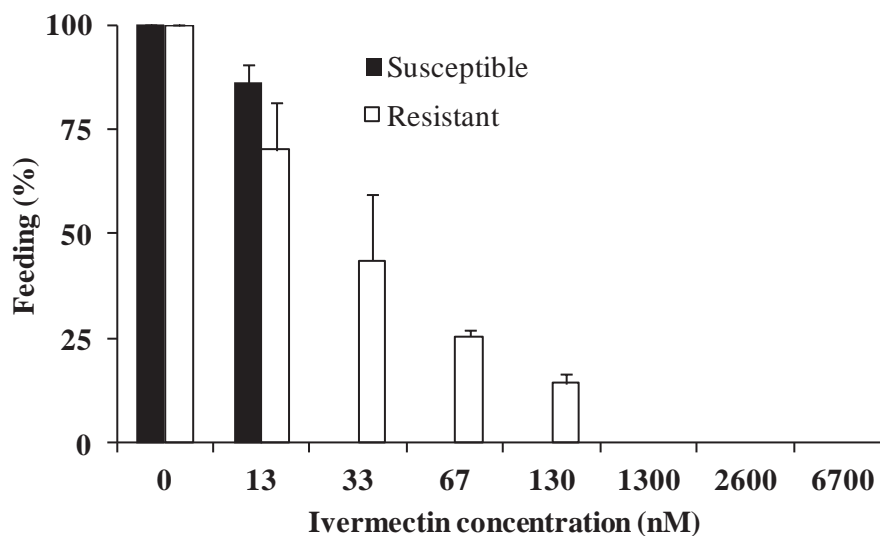


Figure 1: Effect of ivermectin aglycone alone on the feeding behaviour of ivermectin susceptible and ivermectin resistant *T. circumcincta* strains.

The behaviour feeding of both strains in contact with ivermectin aglycone was different between the two strains. Indeed, higher level of ivermectin aglycone was necessary to decrease feeding in ivermectin resistant strain when compared to parental strain. No major toxic effect was observed for both strains at the lowest concentration of ivermectin aglycone. Consequently, assays were further performed at 13 nM of ivermectin aglycone.

We then explored the capacity of ivermectin aglycone to modulate ivermectin efficacy, *in vitro*, in *T. circumcincta* ivermectin resistant strain MTci4 by the larval feeding inhibition test. Valsopodar is a known mammalian ABCB1 inhibitor and was used as a putative positive control for the larval feeding inhibition test. The effects of valsopodar and ivermectin aglycone on feeding behaviour of *T. circumcincta* ivermectin resistant strain are shown Figure 2.

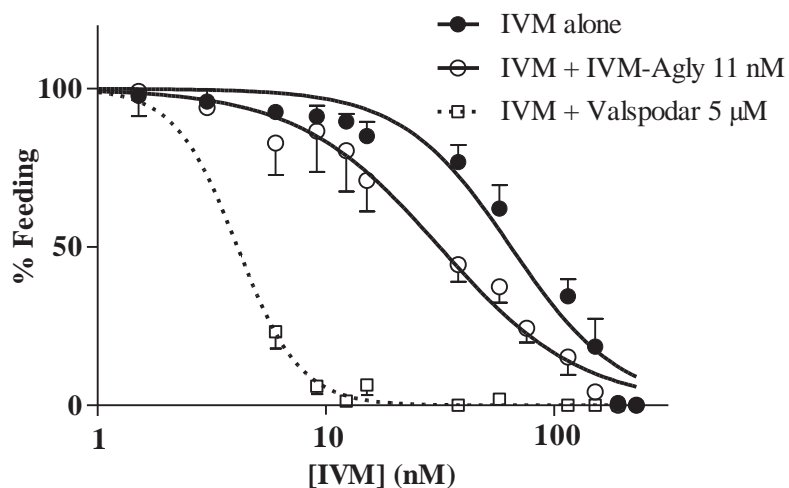


Figure 2: Larval Feeding inhibition dose-reponse curve for *T. circumcineta* ivermectin-resistant isolate (MTci4) using ivermectin (IVM), with or without valspodar or ivermectin aglycone (IVM-Agly)

The feeding of ivermectin resistant *T. circumcineta* was decreased by the co-administration of valspodar and ivermectin aglycone when associated with ivermectin and compared with ivermectin alone. Indeed, the dose-response curves clearly show a curve shift to the left in the presence of valspodar or ivermectin aglycone, reflecting a decrease in larval feeding. The LFI₅₀ values and the sensitivity factor are shown in Table 1.

Table 1: Influence of valsopodar and ivermectin aglycone on larval feeding of MTci4 *T. circumcincta*

Treatment	LFI ₅₀ (nM)	Sensitivity Factor (SF)
Ivermectin	67.3 ± 24.5	-
Ivermectin + valsopodar	4.2 ± 1.2 *	16
Ivermectin + Ivermectin aglycone	30.9 ± 12.6 *	2

LFI₅₀ is the concentration needed to alter 50 % of larval feeding. LFI₅₀ value is calculated from 2-7 experiments. Sensitivity factor was determined using the standard formula [(LFI₅₀ of ivermectine alone) ÷ (LFI₅₀ of ivermectin + valsopodar or ivermectin aglycone alone)] on ivermectin resistant *T. circumcincta*. **P* < 0.05 vs. ivermectin.

LFI₅₀ with ivermectin alone was 67.3 ± 24.5 nM. LFI₅₀ with ivermectin combined with valsopodar was 4.2 ± 1.2 nM, reflecting a strong reduction of larvae feeding. In presence of ivermectin aglycone the LFI₅₀ of ivermectin was lowered to 30.9 ± 12.6 nM when compared to LFI₅₀ with ivermectin alone. Consequently, ivermectin was between 2- and 16-fold more potent in presence of vaslpodar and ivermectin aglycone, respectively, as shown by sensitivity factor.

4 Discussion

Many homologues of MDR transporters exist in parasite (Ardelli, 2013) and their over expression partly explain resistance to ivermectin (Lespine A., 2012). Then, their inhibition could increase ivermectin concentration in the parasite and therefore enhance ivermectin efficacy and prevent the development of drug resistance. For this reason, we investigated the effect of mammalian ABC transporter inhibitor on ivermectin efficacy in resistant nematode. Then, the aim of this study was to investigate the ability of ivermectin aglycone and valsopodar to enhance ivermectin efficacy in ivermectin resistant isolate of *T. circumcincta*.

We showed that the presence of valsopodar and ivermectin aglycone increased the susceptibility to ivermectin in resistant isolate of *T. circumcincta*. These results strongly suggest that ABC efflux transporters homologues could play an important role in ivermectin resistant nematode. Our data are strengthened by the finding that valsopodar increased dramatically the efficacy of ivermectin in this model. The findings of this current study are in complete agreement with previous report demonstrating that exposure to valsopodar restores susceptibility to ivermectin in ivermectin resistant *C. elegans* (James and Davey, 2009) and in ivermectin resistant *H. contortus* and *T. circumcincta* (Bartley et al., 2009). Given that valsopodar is a well known ABCB1 inhibitor in mammals, such results strongly suggest that valsopodar could interact and inhibit nematode ABC transporters.

In parallel, the association of ivermectin aglycone with ivermectin was also able to inhibit more potently the feeding of ivermectin resistant isolate of *T. circumcincta* than ivermectin alone. Such results showed that ivermectin aglycone was able to increase the susceptibility to ivermectin in a resistant field parasite. However, the susceptibility to ivermectin was not totally achieved by the use of ivermectin aglycone and was less evident than that of valsopodar. In one way, partial effect could be explain by the very low concentration of ivermectin aglycone used in the assay (nM) chosen in order to avoid intrinsic anthelmintic effect. Our data are encouraging to the challenge of improving ivermectin efficacy. Given that ivermectin aglycone is safe in mammals (data not shown), it will be consider quietly to increase ivermectin aglycone concentrations. In that condition, we hope higher efficacy of ivermectin. As valsopodar, such results strongly suggest that ivermectin aglycone could interact with homologues of mammalian ABC transporters in nematodes.

In another way, other transporters such as ABCCs or other detoxification systems such as cytochromes may also be involved and may explain the partial effect. Then, specific relevant

inhibitors may be used such as piperonyl butoxide (AlGusbi et al., 2014) to verify such hypothesis.

Since it is unclear to what extent activity *in vitro* can be correlated with activity *in vivo*, any extrapolation of *in vitro* results from laboratory should be taken with caution. However, numerous *in vivo* studies have shown that anthelmintic combined with ABCB1 inhibitor such as verapamil or others has generally resulted in an enhancement of drug efficacy (Molento et al., 2004; Xu et al., 1998). It will be important to demonstrate the capacity of ivermectin aglycone in association with ivermectin to restore *in vivo* the efficacy of ivermectin in animals infected with macrocyclic lactone resistant nematodes.

In conclusion, this study demonstrates that ivermectin aglycone is able to increase susceptibility to ivermectin in drug resistant nematode.

The molecular mechanisms by which ivermectin aglycone and valspodar interact with nematode ABC efflux transporter remain to be elucidated as the correlation between such ABC transporter inhibition and enhanced ivermectin efficacy. These findings support the view that ABC efflux transporters could play an important role in the mechanism of ivermectin resistance in *T. circumcincta*. The combination of ivermectin with ivermectin aglycone could be useful for increasing anthelmintic efficacy against parasites in livestock and this will contribute to delay drug resistance development. In that respect, the patent WO 2013057222 A2 named “Use of avermectin derivative for increasing bioavailability and efficacy of macrocyclic lactones “ has been proposed and filed by our laboratory.

- AlGusbi, S., J. Krucken, S. Ramunke, G. von Samson-Himmelstjerna and J. Demeler, 2014, Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes, *Int J Parasitol* 44, 647.
- Ardelli, B.F., 2013, Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes, *Parasitol Int* 62, 639.
- Bartley, D.J., E. Jackson, K. Johnston, R.L. Coop, G.B. Mitchell, J. Sales and F. Jackson, 2003, A survey of anthelmintic resistant nematode parasites in Scottish sheep flocks, *Vet Parasitol* 117, 61.
- Bartley, D.J., H. McAllister, Y. Bartley, J. Dupuy, C. Menez, M. Alvinerie, F. Jackson and A. Lespine, 2009, P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*, *Parasitology* 136, 1081.
- Geary, T.G., S.M. Sims, E.M. Thomas, L. Vanover, J.P. Davis, C.A. Winterrowd, R.D. Klein, N.F. Ho and D.P. Thompson, 1993, *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx, *Exp Parasitol* 77, 88.
- Jackson, F., R.L. Coop, E. Jackson, E.W. Scott and A.J. Russel, 1992, Multiple anthelmintic resistant nematodes in goats, *Vet Rec* 130, 210.
- James, C.E. and M.W. Davey, 2009, Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*, *Int J Parasitol* 39, 213.
- Kotze, A.C., 1998, Effects of macrocyclic lactones on ingestion in susceptible and resistant *Haemonchus contortus* larvae, *J Parasitol* 84, 631.
- Lespine A., M.C., Bourguinat C., Prichard R.K., 2012, P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: "Prospects for reversing transport-dependant anthelmintic resistance, *Int J Parasitol* 2, 58.
- Molento, M.B., A. Lifschitz, J. Sallovitz, C. Lanusse and R. Prichard, 2004, Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep, *Parasitol Res* 92, 121.
- Sheriff, J.C., A.C. Kotze, N.C. Sangster and R.J. Martin, 2002, Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on feeding and pharyngeal pumping in *Trichostrongylus colubriformis* in vitro, *Parasitology* 125, 477.
- Xu, M., M. Molento, W. Blackhall, P. Ribeiro, R. Beech and R. Prichard, 1998, Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog, *Mol Biochem Parasitol* 91, 327.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les nématodes gastro-intestinaux (GIN) sont responsables de lourdes pertes économiques dans le secteur de l'élevage. L'avènement d'antiparasitaires à large spectre dans les années 1960 a offert un moyen performant pour contrôler ces parasites. Les lactones macrocycliques anthelminthiques (LMs) sont devenues les piliers du traitement de ces parasites. Cependant, à cause d'une utilisation intensive de ces médicaments, des résistances aux LMs chez les parasites gastro-intestinaux se sont développées au sein des élevages du monde entier mettant en péril l'efficacité thérapeutique de ces molécules (Kaplan and Vidyashankar, 2012). Compte tenu du faible investissement des industriels dans le développement de nouveaux antiparasitaires et de l'ampleur de la résistance aux anthelminthiques, un des enjeux réside dans l'optimisation de l'utilisation des molécules existantes en limitant le développement des résistances. Le succès des approches mises en jeu repose sur la connaissance des mécanismes impliqués dans la résistance aux LMs.

Dans ce contexte, l'objectif de la thèse a été d'une part de mieux comprendre les interactions entre les LMs antiparasitaires et les acteurs moléculaires impliqués dans l'efficacité thérapeutique et le développement de résistance, tel que les transporteurs ABC multidrogues et les cytochromes P450, chez l'hôte mais aussi chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*. D'autre part, il a été de tester des associations thérapeutiques d'intérêt afin de potentialiser l'efficacité des LMs chez les nématodes.

Régulation des systèmes de détoxification de l'ivermectine par l'ivermectine chez la souris

Compte tenu de l'utilisation fréquente des anthelminthiques et de l'existence de formulations à longue rémanence, nous avons recherché l'impact d'une exposition répétée à l'ivermectine sur les systèmes de détoxification. Nous avons montré chez la souris que lorsque l'ivermectine était administrée oralement de façon répétée, elle entraînait l'induction de gènes codant pour les transporteurs ABC *Abcb1a*, *Abcc2*, et pour les enzymes de biotransformation, *Cyp2b10* et *Cyp1a1* au niveau de la muqueuse intestinale, les mêmes qui sont responsables du devenir de l'ivermectine dans l'organisme (**Chapitre 1**). L'effet inducteur des LMs sur l'expression des gènes codant pour les enzymes des systèmes de détoxification est connu et avait été mis en évidence chez le mammifère (Ménez et al., 2012a) et chez d'autres espèces insectes et parasites (Ardelli and Prichard, 2008; Bygarski et al., 2014; Igboeli et al., 2013; James and Davey, 2009; Luo et al., 2013b; Pohl et al., 2014; Tribble et al., 2007; Yoon et al., 2011). Dans notre étude, les surexpressions ont conduit à une sous exposition à l'ivermectine ainsi qu'à une perturbation de son métabolisme qui sont des conditions induisant la réduction de l'efficacité thérapeutique d'un médicament et par

conséquent favorisant le développement de résistance. En accord avec nos résultats, un prétraitement par des inducteurs d'ABCB1 et des CYP P450s entraîne une moindre disponibilité de l'ivermectine chez l'hôte et était corrélé à une moindre activité anthelminthique (Areskog et al., 2012; Ballent et al., 2010; McKellar and Benchaoui, 1996).

Intervention des facteurs de transcriptions dans la régulation des gènes codant pour les enzymes des systèmes de détoxification par l'ivermectine

Ces premiers résultats montrent que l'ivermectine peut réguler les gènes responsables de sa propre métabolisation, comme cela est le cas pour la plupart des xénobiotiques, comme par exemple le phénobarbital, le dexaméthasone ou encore la rifampicine (Rushmore and Kong, 2002). La régulation de l'expression des gènes codant pour les systèmes de détoxification peut être médiée par des mécanismes transcriptionnels. Parmi les mécanismes transcriptionnels, les récepteurs nucléaires, incluant Ahr, CAR, PXR, FXR, VDR, LXR, ER, GR, et TR ont été tous impliqués dans la régulation des gènes codant pour les enzymes de biotransformations ainsi que les transporteurs ABC d'efflux, en réponse à des activateurs exogènes et endogènes. Une étude précédemment effectuée dans l'équipe et réalisée sur le même modèle de lignée cellulaire d'hépatocytes, a montré que l'ivermectine n'était pas ligand des récepteurs nucléaires CAR, PXR et Ahr (Ménez et al., 2012a). Cette approche est très intéressante. En effet, les cellules expriment le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 fusionné avec les différents domaines de liaison aux ligands des RNs permettant par bioluminescence d'étudier la capacité de l'ivermectine à activer spécifiquement certains RNs. Cette approche permettrait d'étudier la capacité de l'ivermectine à activer les autres RNs tel que VDR, ER, GR ou TR par exemple.

Nous avons recherché les RNs qui pouvaient être responsable de l'induction de l'expression génique d'*Abcb1* suite à une exposition à l'ivermectine (**Chapitre 2**). LXR et FXR sont deux récepteurs nucléaires activés par des lipides et impliqués dans la régulation d'*ABCB1* (Jiang et al., 2013). De plus, l'ivermectine est un agoniste partiel de FXR (Jin et al., 2013). Nous avons donc étudié leur implication dans la régulation d'*Abcb1* en réponse à l'ivermectine dans les hépatocytes de souris. Aucun des gènes cibles de LXR, *Fasn* (fatty acid synthase) et *Scd1* (Scyltalone déhydratase) ou de FXR, *Abcb4* (ABC transporter B4) et *Shp* (small heterodimer partner) ne sont induit par l'ivermectine dans nos cellules, suggérant que l'ivermectine n'activait pas ces récepteurs nucléaires.

L'expression des gènes de détoxification peut être aussi régulée par d'autres facteurs de transcriptions tels que NRF2 et NF- κ B (**Revue bibliographique**). Notamment, *Abcb1* est induit par NF- κ B (Bentires-Alj et al., 2003; Luo et al., 2013b) et par NRF2 (Aleksunes and

Klaassen, 2012), qui contrôlent aussi les mécanismes d'inflammation. De plus, l'activation d'*Abcb1* survient à la suite d'une liaison et de l'activation de NF- κ B sur le promoteur d'*Abcb1*. NF- κ B a aussi été décrit comme intermédiaire pour une régulation rapide d'*Abcb1* en réponse à une exposition à une autre lactone macrocyclique, l'ivermectine (Luo et al., 2013b; Sui et al., 2012). NRF2 induit l'homologue d'*ABCBI* chez la drosophile en réponse à une exposition à de multiples xénobiotiques (Misra et al., 2014). Ainsi, nous avons recherché l'impact de l'ivermectine sur les cibles de tels facteurs de transcriptions. Nous avons montré que l'ivermectine entraînait une forte induction du gène codant pour l'interleukine 6 (IL6). Cette interleukine est généralement considérée comme une cytokine permettant de protéger les hépatocytes à la suite d'une blessure hépatique aigüe. Quelques études montrent que l'ivermectine provoque du stress oxydant (Zhu et al., 2013) et est reflété, à la fois, par une diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes (El-Shenawy, 2010; Li et al., 2013) et par une augmentation des taux de facteurs inflammatoires tels que IL-1 β , TNF- α , IL-4 ou iNOS (Chen et al., 2013; Liu et al., 2014). En accord avec nos résultats, il se pourrait alors que l'ivermectine induise une inflammation aigüe des hépatocytes entraînant la surexpression d'*Il6*. Toutefois l'utilisation du BAY-11-7082, inhibiteur de la voie NF- κ B, montre que cette voie n'est que partiellement impliqué lors d'une exposition à l'ivermectine. Vu que NRF2 est décrit pour induire l'expression d'IL6 lors de stress oxydant (Wruck et al., 2011), il se peut que les effets présentés dans ces travaux soient un effet additif des deux voies NF- κ B et NRF2. Des études complémentaires, en utilisant en simultanément les inhibiteurs des voies NF- κ B et NRF2 serait une stratégie intéressante pour vérifier cette hypothèse. Nous pourrions ainsi vérifier si cet effet additif explique les surexpressions d'*Abcb1a* et d'*Abcb1b*.

D'autres études ont montré qu'*Abcb1* pouvait aussi être régulé par d'autres récepteurs nucléaires tels que ER (Arias et al., 2014), GR (Narang et al., 2008), VDR (Chow et al., 2011) et TR (Kurose et al., 2008), l'implication de ces facteurs de transcriptions dans la régulation d'*Abcb1* en réponse à l'ivermectine ne peut être écartée. Il serait donc indispensable de tester la capacité de l'ivermectine à activer ces récepteurs nucléaires comme proposé plus haut.

Implication des récepteurs nucléaires dans la tolérance et l'acquisition de la résistance à l'ivermectine chez le nématode modèle *C.elegans*

En parallèle des études réalisées sur le modèle murin, nous avons étudié, chez *C. elegans*, l'implication des homologues de facteurs de transcription, connus pour réguler *Abcb1* chez le mammifère, dans la sensibilité et le développement de la résistance à l'ivermectine (**Chapitre 3**). Nous avons testé l'implication de 9 NHRs d'intérêt et montré que, l'un d'entre eux, *nhr-a* était important dans la tolérance à l'ivermectine des vers sensibles et résistants,

ainsi que dans le développement de la résistance à l'ivermectine. Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus lors d'études précédentes qui montraient l'implication de récepteurs nucléaires dans le métabolisme et la sensibilité de *C. elegans* à des xénobiotiques. Nous avons montré que l'extinction du récepteur nucléaire *nhr-a* chez la souche résistante à l'ivermectine permettait d'augmenter la sensibilité à l'ivermectine. Ces résultats suggèrent donc que *nhr-a* jouerait un rôle dans la régulation des transporteurs qui ont été préalablement décrits comme surexprimés au sein de cette lignée résistante (James and Davey, 2009). Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la création d'une lignée issue du croisement de cette lignée résistante à l'ivermectine avec la lignée mutante *nhr-a*. Elle permettrait d'étudier si la sensibilité de cette nouvelle souche à l'ivermectine est augmentée. Par ailleurs, une étude transcriptomique permettrait de déterminer si l'expression des gènes surexprimés chez la lignée résistante, est bien diminuée lors de l'absence de *nhr-a*. La réponse aux xénobiotiques chez *C. elegans* est hautement spécialisée et contrôlée par de multiples régulateurs. Afin de découvrir la complexité d'une telle induction métabolique, lors d'une étude antérieure, *C. elegans* a été exposé à quatre xénobiotiques différents. Les auteurs ont utilisé une approche transcriptomique sans a priori, par RNAi, leur permettant d'étudier l'implication des 387 facteurs de transcription chez *C. elegans* dans la réponse à chacun des xénobiotiques. Aucun des récepteurs nucléaires préalablement décrits dans le métabolisme des xénobiotiques chez le nématode n'ont été requis pour l'induction des gènes du métabolisme préalablement observés. En revanche, les résultats ont démontré que le facteur de transcription, *nhr-176*, modulait la sensibilité à l'anthelminthique thiabendazole (Jones et al., 2013). Dans notre étude, nous avons observé une réversion partielle de la résistance à l'ivermectine lorsque *nhr-a* était éteint, il se pourrait alors que ce récepteur nucléaire joue aussi un rôle dans la résistance à l'ivermectine.

Dans tous les organismes, les enzymes du métabolisme représentent une défense efficace envers les possibles conséquences négatives d'un contact avec les xénobiotiques. Il a été montré que lorsque *C. elegans* était exposé à des xénobiotiques, il se défend contre ce stress chimique via une induction des systèmes de biotransformations. Cela a été bien décrit pour les enzymes de biotransformations (Reichert and Menzel, 2005). Lorsque l'on sait que les auteurs ont appliqué une approche sans a priori à l'aide d'une puce à ADN sur la totalité du génome de *C. elegans*, il est surprenant de ne pas voir apparaître de résultats concernant les transporteurs ABC, sachant qu'une implication des transporteurs dans la sensibilité accrue des *C. elegans* aux xénobiotiques, aux toxines bactériennes ou encore aux métaux lourds a été rapportée. En effet, il a été montré qu'une déficience en *Abcb1* et *Abcb3* induit une sensibilité accrue à la phénazine (Mahajan-Miklos et al., 1999). Aussi, la délétion d'*Abcb3* rend les

animaux sensibles à la colchicine et à la chloroquine (Broeks et al., 1995). Enfin, des animaux déficients en *Abcb1* et en *Abcc1*, ont été décrits comme étant hypersensibles aux métaux lourds (Broeks et al., 1996). Par conséquent, l'absence de donnée soulève alors la question de savoir si cela est lié à l'absence d'induction de l'expression des gènes codant pour les transporteurs ABC en réponse aux différents xénobiotiques ou bien au choix des auteurs de se focaliser sur les enzymes de phase I et II. La raison pour laquelle les auteurs ne les mentionnent pas est méconnue. Toujours chez *C. elegans*, une étude a révélé l'induction de l'expression des gènes *CYP35A1*, *CYP35A2* et *CYP35C2* en réponse à une exposition à différents xénobiotiques (Menzel et al., 2005). L'induction de ces gènes semble être commune à la détoxification de nombreux composés. Il serait intéressant de voir s'il est aussi induit lors d'une exposition à l'ivermectine.

Hypothèse concernant la résistance à l'ivermectine chez le nématode

A l'heure actuelle, ni les gènes codant pour les différents sous-unités des canaux chlorures glutamate-dépendants, ni ceux codant pour les transporteurs ABC ne permettent d'expliquer à eux seuls la résistance à l'ivermectine.

Une étude récente révèle que la perte de fonction de l'allèle *Dyf-7* est fortement liée à la résistance à l'ivermectine (Urdaneta-Marquez et al., 2014). Cette perte de fonction est responsable d'un défaut structural des amphides. La force de cette étude est qu'elle montre que différents isolats de *H. contortus* résistants à l'ivermectine, provenant de 5 continents différents, sont enrichis en un haplotype de ce gène. L'enrichissement en cet haplotype est corrélé à une diminution de l'expression de *Dyf-7* et à un défaut des neurones sensoriels au sein des souches résistantes à l'ivermectine. Ainsi, *Dyf-7* pourrait être un marqueur moléculaire fort pour la détection de la résistance à l'ivermectine. Cependant, le mécanisme précis par lequel un défaut de neurones sensoriels entraîne la résistance à l'ivermectine reste à être élucidé. Chez *C. elegans*, il existe deux surfaces majeures qui agissent comme interface avec les nutriments de l'environnement. La première est la surface apicale des cellules intestinales et la seconde se situe au niveau des neurones sensoriels et olfactifs situés au niveau des amphides (Walker et al., 2005). L'implication des amphides dans la perception de la nourriture suggère alors que les nématodes déficients en *Dyf-7* seraient sujets à un défaut d'alimentation.

En étudiant une souche de *C. elegans* résistante à l'ivermectine, il a été montré une détérioration de la fonction de pompe du pharynx résultant en une réduction de prise alimentaire. Il est important de noter que l'étude a été réalisée chez une souche particulière de

résistance à l'ivermectine. En effet, cette lignée est déficiente pour 3 sous unités codant pour les canaux chlorure glutamate dépendant, ce qui lui confère une haute résistance à l'ivermectine. Le fait que cette lignée ait une détérioration du pompage du pharynx, malgré l'absence des cibles de l'ivermectine, suggère que l'ivermectine agit ailleurs que sur les canaux chlorures glutamate-dépendants. De façon intéressante, l'ivermectine a été récemment décrite pour avoir la capacité d'inhiber d'autres récepteurs, les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (Hernando and Bouzat, 2014). De tels résultats laissent penser qu'au sein des lignées résistantes, l'ivermectine inhiberait à la fois les récepteurs chlorures glutamates-dépendants et les récepteurs nicotiques.

Au bilan, il semblerait que la surexpression des transporteurs représente un événement important lors du développement de la résistance à l'ivermectine (**Chapitre 3**). Elle constituerait une première barrière de protection chez le parasite en limitant la quantité de médicament qui arrive à la cible. Le nématode serait par conséquent en contact avec des doses subthérapeutiques d'ivermectine qui sont des conditions idéales pour sélectionner les individus ayant des gènes de la résistance comme l'haplotype du gène *Dyf-7* (Urdaneta-Marquez et al., 2014). La présence de l'haplotype *Dyf 7* conférant la résistance à l'ivermectine dans des populations de nématodes sensibles, même à une fréquence inférieure à 1 %, suggère que le développement de résistance à ce médicament sera inéluctable. En bloquant les transporteurs, cela éviterait cette sélection et ralentirait le développement de résistance.

Dans ce contexte, la suite des travaux de cette thèse ont été de tester le potentiel de composés d'intérêt à inhiber les transporteurs ABC et d'étudier leur impact sur l'efficacité de l'ivermectine.

Etude de la capacité d'inhibiteurs à potentialiser l'efficacité de l'ivermectine chez le nématode

Dans ces études, nous avons montré que des composants alimentaires, les flavonoïdes et notamment la phlorétine et le kaempferol, potentialisent l'efficacité de l'ivermectine chez une lignée de *C. elegans* résistante à cette drogue (**Chapitre 4**). Les flavonoïdes ont été décrits comme inhibiteurs des transporteurs ABC (Chen et al., 2010) et sont déjà proposés en tant qu'inhibiteurs pour reverser la résistance de cellules cancéreuses causée par une surexpression des transporteurs (Bansal et al., 2009; Ravishankar et al., 2013). Nos résultats suggèrent la possible inhibition des transporteurs ABC que l'on sait surexprimés dans cette lignée (James and Davey, 2009). Les flavonoïdes interagissent avec les récepteurs nucléaires et entraînent une modulation de l'expression des gènes cibles (Avior et al., 2013), les effets observés dans

notre étude, pourraient être le reflet soit d'un effet direct sur les transporteurs soit d'une inhibition des récepteurs nucléaires responsables de la surexpression des transporteurs ABC dans la lignée de *C. elegans* résistante à l'ivermectine. Des études de qPCR menées en parallèle des tests phénotypiques, étudiant l'expression des gènes codant pour les transporteurs surexprimés au sein de cette lignée résistante, nous permettraient de répondre à cette hypothèse.

Au sein de la famille des LMs, l'ivermectine aglycone a été identifiée comme candidat potentiel pour inhiber les transporteurs ABC sur la base de sa structure et de sa faible toxicité. Nous avons montré que l'ivermectine aglycone était capable de potentialiser l'efficacité de l'ivermectine chez une souche de terrain *T. circumcincta* résistante à l'ivermectine (**Chapitre 5**). Cette capacité à reverser la résistance aux médicaments chez le nématode, et sa faible neurotoxicité font de l'ivermectine aglycone une molécule de choix pour reverser la résistance aux médicaments.

Nos travaux amènent de nombreuses perspectives dans chacune des recherches réalisées au cours de ce travail de thèse. En ce sens, des études complémentaires devront être réalisées afin de répondre aux nombreuses questions soulevées.

➤ **Gènes régulés par l'ivermectine ou ses métabolites**

Chez la souris, les systèmes de détoxification sont modulés *in vitro* et *in vivo* par l'ivermectine et entraînent une moindre disponibilité de l'ivermectine *in vivo*.

Il serait pertinent d'isoler le métabolite 26- hydroxy ivermectine et d'étudier son impact, *in vitro*, sur l'expression des gènes codant pour les principaux transporteurs ABC et cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de l'ivermectine.

La prochaine étape serait de vérifier si les surexpressions des gènes des systèmes de détoxification que l'on a observées chez la souris se produisent lors de traitements à l'ivermectine dans des conditions de terrain chez les animaux de production.

➤ **Régulations transcriptionnelles**

Dans une lignée d'hépatocytes murins en culture, NF- κ B et NRF2 sont partiellement impliqués dans la surexpression d'*Abcb1a* et *Abcb1b*.

Les lignées cellulaires d'hépatocytes sont reconnues pour être un modèle cellulaire adapté afin d'étudier le potentiel des médicaments à induire les enzymes des phases I et II ainsi que les transporteurs impliqués dans le métabolisme des médicaments (Nishimura et al., 2006; Nishimura et al., 2002). Compte tenu du faible taux d'expression constitutive des enzymes de

biotransformations dans ce modèle, le processus de biotransformation des molécules d'intérêt est faible. Le faible taux d'expression des récepteurs nucléaires (Eveillard et al., 2009; Ménez et al., 2012a) constitue une limite importante dans notre étude. Pour montrer la participation de ces RNs dans la surexpression des gènes codant pour les systèmes de biotransformation en réponse à l'ivermectine, il est important de compléter nos études avec un modèle d'hépatocytes primaire en culture. Ce modèle est très utilisé pour des études de pharmacologies impliquant les transporteurs et les enzymes de biotransformation en général. De plus, les cellules en culture primaire sont plus représentatives du tissu d'où elles proviennent que les cultures cellulaires.

Pour mettre en évidence le(s) facteur(s) de transcription activés par l'ivermectine. Nous pouvons envisager *in vitro* (i) d'inhiber la voie NF- κ B en inhibant son activation via la voie GSK3, (ii) d'inhiber la voie NRF2, (iii) d'étudier la capacité à l'ivermectine à activer d'autres facteurs de transcription tels que ER, GR et VDR. *In vivo* chez la souris, nous étudierons l'impact de la déficience en facteur de transcription, chez des souris déficientes pour le récepteur nucléaire d'intérêt traitées à l'ivermectine, sur la cinétique de l'ivermectine, la toxicité de l'ivermectine ainsi que sur l'expression des gènes de détoxification de son propre métabolisme.

➤ **Le récepteur nucléaire NHR-A**

NHR-A est partiellement impliqué dans la sensibilité et le développement de la résistance à l'ivermectine

Il serait indispensable à ce stade d'établir le lien entre le facteur de transcription d'intérêt et la surexpression des gènes codant pour les transporteurs ABC.

Pour cela, il serait pertinent, chez *C. elegans* de créer une nouvelle lignée issue du croisement de la souche IVR10, résistante à l'ivermectine, et de la souche *nhr-a* mutante. Ceci dans le but d'étudier sa sensibilité à l'ivermectine et également, d'étudier l'expression des gènes cibles par transcriptomique sans a priori à l'aide d'une puce microarray. Il serait également intéressant de voir l'implication d'autres facteurs de transcription, tel que *nhr-176* impliqué dans les régulations de cytochromes. Par la suite, l'extinction de plusieurs facteurs de transcription pourrait être envisagée.

Les résultats obtenus chez *C. elegans* seront des bases précieuses pour étudier ces mécanismes chez les nématodes parasites d'intérêt clinique. Cela sera considérablement facilité par le génome d'*H. contortus* récemment séquencé, annoté et disponible (Laing et al., 2013). Dans

un premier temps, il serait important d'étudier la capacité des transporteurs ABC de *H. contortus* à transporter les LMs et à être impliqués dans la résistance. Pour cela des modèles *in vitro* surexprimant les transporteurs de parasites seront des outils précieux. (En cours, Marion David et Roger Prichard, McGill Canada). Par la suite, l'homologue de *nhr-a* sera recherché et s'il existe, son expression chez *C. elegans* déficients en *nhr-a*, nous permettra d'évaluer la sensibilité à l'ivermectine.

➤ Les flavonoïdes

La phlorétine et le kaempferol potentialisent l'efficacité de l'ivermectine chez la lignée *C. elegans* résistante à l'ivermectine. Il serait intéressant de tester ces composés sur les parasites de terrain. Des tests sur le développement des larves, *in vitro*, sur des souches d' *H. contortus* sont en en cours en collaboration avec l'unité INRA ISP (Guillaume Sallé, INRA Nouzilly). La combinaison de flavonoïdes avec l'ivermectine chez des animaux parasités et sont actuellement réalisés en collaboration avec l'ENV de Toulouse (Hervé Hoste).

Vu que les flavonoïdes interagissent avec les récepteurs nucléaires, il serait intéressant d'étudier *in vitro* sur lignée d'hépatocytes en culture, leur capacité à être ligand des récepteurs nucléaires.

➤ L'ivermectine aglycone

L'ivermectine aglycone potentialise l'efficacité de l'ivermectine chez la lignée *T. circumcincta* résistante à l'ivermectine. L'effet étant partiel, il serait judicieux dans un premier temps d'augmenter les concentrations en ivermectine aglycone. L'association de l'ivermectine avec l'ivermectine aglycone chez le mouton parasité est actuellement en cours de réalisation en collaboration avec le Moredum Institute (Dave Bartley).

1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018.
- Accardi, M.V., Beech, R.N., Forrester, S.G., 2012. Nematode cys-loop GABA receptors: biological function, pharmacology and sites of action for anthelmintics. *Invert Neurosci* 12, 3-12.
- Albérich, M., Menez, C., Sutra, J.F., Lespine, A., 2014. Ivermectin exposure leads to up-regulation of detoxification genes in vitro and in vivo in mice. *Eur J Pharmacol* 740, 428-435.
- Aleksunes, L.M., Klaassen, C.D., 2012. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPARalpha-, and Nrf2-null mice. *Drug Metab Dispos* 40, 1366-1379.
- AlGusbi, S., Krucken, J., Ramunke, S., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., 2014. Analysis of putative inhibitors of anthelmintic resistance mechanisms in cattle gastrointestinal nematodes. *Int J Parasitol* 44, 647-658.
- Alimirah, F., Peng, X., Yuan, L., Mehta, R.R., von Knethen, A., Choubey, D., Mehta, R.G., 2012. Crosstalk between the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and the vitamin D receptor (VDR) in human breast cancer cells: PPARgamma binds to VDR and inhibits 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 mediated transactivation. *Exp Cell Res* 318, 2490-2497.
- Alvinerie, M., Dupuy, J., Eeckhoutte, C., Sutra, J.F., 1999. Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. *Parasitol Res* 85, 920-922.
- Alvinerie, M., Dupuy, J., Kiki-Mvouaka, S., Sutra, J.F., Lespine, A., 2008. Ketoconazole increases the plasma levels of ivermectin in sheep. *Vet Parasitol* 157, 117-122.
- An, G., Gallegos, J., Morris, M.E., 2011. The bioflavonoid kaempferol is an Abcg2 substrate and inhibits Abcg2-mediated quercetin efflux. *Drug Metab Dispos* 39, 426-432.
- Ardelli, B., Prichard, R., 2008. Effects of Ivermectin and Moxidectin on the Transcription of Genes Coding for Multidrug Resistance Associated Proteins and Behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol* 40, 290-298.
- Ardelli, B.F., 2013. Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes. *Parasitol Int* 62, 639-646.
- Ardelli, B.F., Guerriero, S.B., Prichard, R.K., 2005. Genomic organization and effects of ivermectin selection on *Onchocerca volvulus* P-glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 143, 58-66.
- Ardelli, B.F., Guerriero, S.B., Prichard, R.K., 2006. Ivermectin imposes selection pressure on P-glycoprotein from *Onchocerca volvulus*: linkage disequilibrium and genotype diversity. *Parasitology* 132, 375-386.
- Ardelli, B.F., Prichard, R.K., 2004. Identification of variant ABC-transporter genes among *Onchocerca volvulus* collected from ivermectin-treated and untreated patients in Ghana, West Africa. *Ann Trop Med Parasitol* 98, 371-384.
- Ardelli, B.F., Prichard, R.K., 2007. Reduced genetic variation of an *Onchocerca volvulus* ABC transporter gene following treatment with ivermectin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101, 1223-1232.
- Ardelli, B.F., Prichard, R.K., 2012. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Vet Parasitol*.
- Ardelli, B.F., Prichard, R.K., 2013. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Vet Parasitol* 191, 264-275.
- Arena, J.P., Liu, K.K., Paress, P.S., Frazier, E.G., Cully, D.F., Mrozik, H., Schaeffer, J.M., 1995. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J Parasitol* 81, 286-294.
- Areskog, M., von Samson-Himmelstjerna, G., Alvinerie, M., Sutra, J.F., Hoglund, J., 2012. Dexamethasone treatment interferes with the pharmacokinetics of ivermectin in young cattle. *Vet Parasitol* 190, 482-488.

- Arias, A., Rigalli, J.P., Villanueva, S.S., Ruiz, M.L., Luquita, M.G., Perdomo, V.G., Vore, M., Catania, V.A., Mottino, A.D., 2014. Regulation of expression and activity of multidrug resistance proteins MRP2 and MDR1 by estrogenic compounds in Caco-2 cells. Role in prevention of xenobiotic-induced cytotoxicity. *Toxicology* 320, 46-55.
- Artho, R., Schnyder, M., Kohler, L., Torgerson, P.R., Hertzberg, H., 2007. Ivermectin-resistance in gastrointestinal nematodes of Boer goats and Dorper sheep in Switzerland. *Vet Parasitol* 144, 68-73.
- Assem, M., Schuetz, E.G., Leggas, M., Sun, D., Yasuda, K., Reid, G., Zelcer, N., Adachi, M., Strom, S., Evans, R.M., Moore, D.D., Borst, P., Schuetz, J.D., 2004. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J Biol Chem* 279, 22250-22257.
- Avior, Y., Bomze, D., Ramon, O., Nahmias, Y., 2013. Flavonoids as dietary regulators of nuclear receptor activity. *Food Funct* 4, 831-844.
- Baker, E.K., El-Osta, A., 2004. MDR1, chemotherapy and chromatin remodeling. *Cancer Biol Ther* 3, 819-824.
- Baker, E.K., Johnstone, R.W., Zalberg, J.R., El-Osta, A., 2005. Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 24, 8061-8075.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Mate, L., Lanusse, C., 2010. Pretreatment with the inducers rifampicin and phenobarbital alters ivermectin gastrointestinal disposition. *J Vet Pharmacol Ther* 33, 252-259.
- Ballent, M., Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Lanusse, C., 2007. Involvement of P-glycoprotein on ivermectin kinetic behaviour in sheep: itraconazole-mediated changes on gastrointestinal disposition. *J Vet Pharmacol Ther* 30, 242-248.
- Bansal, T., Jaggi, M., Khar, R.K., Talegaonkar, S., 2009. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy. *J Pharm Pharm Sci* 12, 46-78.
- Bao, L., Hazari, S., Mehra, S., Kaushal, D., Moroz, K., Dash, S., 2012. Increased expression of P-glycoprotein and doxorubicin chemoresistance of metastatic breast cancer is regulated by miR-298. *Am J Pathol* 180, 2490-2503.
- Bartley, D.J., Jackson, E., Johnston, K., Coop, R.L., Mitchell, G.B., Sales, J., Jackson, F., 2003. A survey of anthelmintic resistant nematode parasites in Scottish sheep flocks. *Vet Parasitol* 117, 61-71.
- Bartley, D.J., McAllister, H., Bartley, Y., Dupuy, J., Menez, C., Alvinerie, M., Jackson, F., Lespine, A., 2009. P-glycoprotein interfering agents potentiate ivermectin susceptibility in ivermectin sensitive and resistant isolates of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 136, 1081-1088.
- Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.P., Bours, V., 2003. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* 22, 90-97.
- Berman, J.R., Kenyon, C., 2006. Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by kri-1 and lipophilic-hormone signaling. *Cell* 124, 1055-1068.
- Bhalla, S., Ozalp, C., Fang, S., Xiang, L., Kemper, J.K., 2004. Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J Biol Chem* 279, 45139-45147.
- Blackhall, W.J., Liu, H.Y., Xu, M., Prichard, R.K., Beech, R.N., 1998. Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 95, 193-201.
- Bourguignon, L.Y., Spevak, C.C., Wong, G., Xia, W., Gilad, E., 2009. Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells. *J Biol Chem* 284, 26533-26546.

- Bourguinat, C., Ardelli, B.F., Pion, S.D., Kamgno, J., Gardon, J., Duke, B.O., Boussinesq, M., Prichard, R.K., 2008. P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for ivermectin resistance selection in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 158, 101-111.
- Bourguinat, C., Keller, K., Blagburn, B., Schenker, R., Geary, T.G., Prichard, R.K., 2011. Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. *Vet Parasitol* 176, 374-381.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Britton, C., Winter, A.D., Gillan, V., Devaney, E., 2014. microRNAs of parasitic helminths - Identification, characterization and potential as drug targets. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 4, 85-94.
- Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M., Plasterk, R.H., 1996. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* 15, 6132-6143.
- Broeks, A., Janssen, H.W., Calafat, J., Plasterk, R.H., 1995. A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins. *Embo J* 14, 1858-1866.
- Burk, O., Arnold, K.A., Geick, A., Tegude, H., Eichelbaum, M., 2005a. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem* 386, 503-513.
- Burk, O., Arnold, K.A., Nussler, A.K., Schaeffeler, E., Efimova, E., Avery, B.A., Avery, M.A., Fromm, M.F., Eichelbaum, M., 2005b. Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 67, 1954-1965.
- Bygarski, E., Prichard, R., Ardelli, B., 2014. 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* 4, 143-151.
- Cervený, L., Svecová, L., Anzenbacherová, E., Vrzal, R., Staud, F., Dvorak, Z., Ulrichová, J., Anzenbacher, P., Pavek, P., 2007. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos* 35, 1032-1041.
- Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., Vercruyssen, J., 2014. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol*.
- Chartier, C., Soubirac, F., Pors, I., Silvestre, A., Hubert, J., Couquet, C., Cabaret, J., 2001. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *J Helminthol* 75, 325-330.
- Chen, C., Zhou, J., Ji, C., 2010. Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sci* 87, 333-338.
- Chen, L.J., Sun, B.H., Qu, J.P., Xu, S., Li, S., 2013. Avermectin induced inflammation damage in king pigeon brain. *Chemosphere* 93, 2528-2534.
- Chen, W., Cai, S.Y., Xu, S., Denson, L.A., Soroka, C.J., Boyer, J.L., 2007. Nuclear receptors RXR α :RAR α are repressors for human MRP3 expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, G1221-1227.
- Chen, Y., Tang, Y., Guo, C., Wang, J., Boral, D., Nie, D., 2012. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem Pharmacol* 83, 1112-1126.
- Cherrington, N.J., Hartley, D.P., Li, N., Johnson, D.R., Klaassen, C.D., 2002. Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 300, 97-104.
- Chisaki, I., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., Iseki, K., 2009. Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver. *Biochim Biophys Acta* 1788, 2396-2403.

- Choe, K.P., Leung, C.K., Miyamoto, M.M., 2012. Unique structure and regulation of the nematode detoxification gene regulator, SKN-1: implications to understanding and controlling drug resistance. *Drug Metab Rev* 44, 209-223.
- Chow, E.C., Durk, M.R., Cummins, C.L., Pang, K.S., 2011. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ up-regulates P-glycoprotein via the vitamin D receptor and not farnesoid X receptor in both *fxr*($-/-$) and *fxr*($+/+$) mice and increased renal and brain efflux of digoxin in mice in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 337, 846-859.
- Ci, X., Li, H., Yu, Q., Zhang, X., Yu, L., Chen, N., Song, Y., Deng, X., 2009. Avermectin exerts anti-inflammatory effect by downregulating the nuclear transcription factor kappa-B and mitogen-activated protein kinase activation pathway. *Fundam Clin Pharmacol* 23, 449-455.
- De Graef, J., Demeler, J., Skuce, P., Mitreva, M., Von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruyse, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2013. Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora* isolate following in vivo and in vitro exposure to macrocyclic lactones. *Parasitology* 140, 499-508.
- Demeler, J., Krucken, J., AlGusbi, S., Ramunke, S., De Graef, J., Kerboeuf, D., Geldhof, P., Pomroy, W.E., von Samson-Himmelstjerna, G., 2013. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Mol Biochem Parasitol* 188, 10-19.
- Denson, L.A., Bohan, A., Held, M.A., Boyer, J.L., 2002. Organ-specific alterations in RAR alpha:RXR alpha abundance regulate rat Mrp2 (*Abcc2*) expression in obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 123, 599-607.
- Dent, J.A., Smith, M.M., Vassilatis, D.K., Avery, L., 2000. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2674-2679.
- Dicker, A.J., Nisbet, A.J., Skuce, P.J., 2011. Gene expression changes in a P-glycoprotein (*Tci-pgp-9*) putatively associated with ivermectin resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 41, 935-942.
- Dickson, M., Gagnon, J.P., 2004. The cost of new drug discovery and development. *Discov Med* 4, 172-179.
- Eckford, P.D., Sharom, F.J., 2009. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* 109, 2989-3011.
- El-Abdellati, A., De Graef, J., Van Zeveren, A., Donnan, A., Skuce, P., Walsh, T., Wolstenholme, A., Tait, A., Vercruyse, J., Claerebout, E., Geldhof, P., 2011. Altered *avr-14B* gene transcription patterns in ivermectin-resistant isolates of the cattle parasites, *Cooperia oncophora* and *Ostertagia ostertagi*. *Int J Parasitol* 41, 951-957.
- El-Abdellati, A., Geldhof, P., Claerebout, E., Vercruyse, J., Charlier, J., 2010. Monitoring macrocyclic lactone resistance in *Cooperia oncophora* on a Belgian cattle farm during four consecutive years. *Vet Parasitol* 171, 167-171.
- El-Shenawy, N.S., 2010. Effects of insecticides fenitrothion, endosulfan and abamectin on antioxidant parameters of isolated rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 24, 1148-1157.
- ElAli, A., Hermann, D.M., 2012. Liver X receptor activation enhances blood-brain barrier integrity in the ischemic brain and increases the abundance of ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on brain capillary cells. *Brain Pathol* 22, 175-187.
- Eng, J.K., Prichard, R.K., 2005. A comparison of genetic polymorphism in populations of *Onchocerca volvulus* from untreated- and ivermectin-treated patients. *Mol Biochem Parasitol* 142, 193-202.
- Eveillard, A., Mselli-Lakhal, L., Mogha, A., Lasserre, F., Polizzi, A., Pascussi, J.M., Guillou, H., Martin, P.G., Pineau, T., 2009. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem Pharmacol* 77, 1735-1746.
- Feng, D.D., Zhang, H., Zhang, P., Zheng, Y.S., Zhang, X.J., Han, B.W., Luo, X.Q., Xu, L., Zhou, H., Qu, L.H., Chen, Y.Q., 2011. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *J Cell Mol Med* 15, 2164-2175.

- Fisher, C., Coleman, T., Plant, N., 2012. Probabilistic orthology analysis of the ATP-binding cassette transporters: implications for the development of multiple drug resistance phenotype. *Drug Metab Dispos* 40, 1397-1402.
- Fisher, M.H., Mrozik, H., 1992. The chemistry and pharmacology of avermectins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32, 537-553.
- Fitzpatrick, J.L., 2013. Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists. *Vet Parasitol* 195, 233-248.
- Fox, L.M., 2006. Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Curr Opin Infect Dis* 19, 588-593.
- Gasbarre, L.C., 2014. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. *Vet Parasitol* 204, 3-11.
- Gasbarre, L.C., Smith, L.L., Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., 2009. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. *Vet Parasitol* 166, 281-285.
- Geary, T.G., 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol* 21, 530-532.
- Geary, T.G., Bourguinat, C., Prichard, R.K., 2011. Evidence for macrocyclic lactone anthelmintic resistance in *Dirofilaria immitis*. *Top Companion Anim Med* 26, 186-192.
- Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F., Thompson, D.P., 1993. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Exp Parasitol* 77, 88-96.
- Geick, A., Eichelbaum, M., Burk, O., 2001. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* 276, 14581-14587.
- Geurden, T., Hoste, H., Jacquiet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., Frangipane di Regalbono, A., Tzanidakis, N., Kostopoulou, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., Noe, L., Vanimisetti, B., Bartram, D., 2014. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Vet Parasitol* 201, 59-66.
- Gonzalez-Canga, A., Fernandez-Martinez, N., Sahagun-Prieto, A., Diez-Liebana, M.J., Sierra-Vega, M., Garcia-Vieitez, J.J., 2009. A review of the pharmacological interactions of ivermectin in several animal species. *Curr Drug Metab* 10, 359-368.
- Goudeau, J., Bellemin, S., Toselli-Mollereau, E., Shamalnasab, M., Chen, Y., Aguilaniu, H., 2011. Fatty acid desaturation links germ cell loss to longevity through NHR-80/HNF4 in *C. elegans*. *PLoS Biol* 9, e1000599.
- Gujja, S., Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Miller, J.E., Mechineni, A., Kommuru, D.S., Shaik, S.A., Lambert, B.D., Cherry, N.M., Burke, J.M., 2013. Effect of supplemental sericea lespedeza leaf meal pellets on gastrointestinal nematode infection in grazing goats. *Vet Parasitol* 191, 51-58.
- Guo, G.L., Lambert, G., Negishi, M., Ward, J.M., Brewer, H.B., Jr., Kliwer, S.A., Gonzalez, F.J., Sinal, C.J., 2003. Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J Biol Chem* 278, 45062-45071.
- Handschin, C., Podvynec, M., Amherd, R., Looser, R., Ourlin, J.C., Meyer, U.A., 2002. Cholesterol and bile acids regulate xenosensor signaling in drug-mediated induction of cytochromes P450. *J Biol Chem* 277, 29561-29567.
- Harmsen, S., Meijerman, I., Maas-Bakker, R.F., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., 2013. PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Pharm Sci* 48, 644-649.
- Hartz, A.M., Madole, E.K., Miller, D.S., Bauer, B., 2012. Estrogen receptor beta signaling through phosphatase and tensin homolog/phosphoinositide 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 down-regulates blood-brain barrier breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther* 334, 467-476.
- Hashmi, S., Tawe, W., Lustigman, S., 2001. *Caenorhabditis elegans* and the study of gene function in parasites. *Trends Parasitol* 17, 387-393.

- Hassan, M.U., Khan, M.N., Abubakar, M., Waheed, H.M., Iqbal, Z., Hussain, M., 2010. Bovine hypodermosis--a global aspect. *Trop Anim Health Prod* 42, 1615-1625.
- Hattinger, C.M., Stoico, G., Michelacci, F., Pasello, M., Scionti, I., Remondini, D., Castellani, G.C., Fanelli, M., Scotlandi, K., Picci, P., Serra, M., 2009. Mechanisms of gene amplification and evidence of coamplification in drug-resistant human osteosarcoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 289-309.
- Henrique, R., Oliveira, A.I., Costa, V.L., Baptista, T., Martins, A.T., Morais, A., Oliveira, J., Jeronimo, C., 2013. Epigenetic regulation of MDR1 gene through post-translational histone modifications in prostate cancer. *BMC Genomics* 14, 898.
- Hernando, G., Bouzat, C., 2014. *Caenorhabditis elegans* neuromuscular junction: GABA receptors and ivermectin action. *PLoS One* 9, e95072.
- Herraez, E., Gonzalez-Sanchez, E., Vaquero, J., Romero, M.R., Serrano, M.A., Marin, J.J., Briz, O., 2012. Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. *Mol Pharm* 9, 2565-2576.
- Herrero, M., Thornton, P.K., 2013. Livestock and global change: emerging issues for sustainable food systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20878-20881.
- Hirai, T., Fukui, Y., Motojima, K., 2007. PPAR α agonists positively and negatively regulate the expression of several nutrient/drug transporters in mouse small intestine. *Biol Pharm Bull* 30, 2185-2190.
- Honorat, M., Mesnier, A., Di Pietro, A., Lin, V., Cohen, P., Dumontet, C., Payen, L., 2008. Dexamethasone down-regulates ABCG2 expression levels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375, 308-314.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol* 22, 253-261.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet Parasitol* 186, 18-27.
- Huang, Y.J., Prichard, R.K., 1999. Identification and stage-specific expression of two putative P-glycoprotein coding genes in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 102, 273-281.
- Hugnet, C., Lespine, A., Alvinerie, M., 2007. Multiple oral dosing of ketoconazole increases dog exposure to ivermectin. *J Pharm Pharm Sci* 10, 311-318.
- Igboeli, O.O., Burka, J.F., Fast, M.D., 2013. Sea lice population and sex differences in P-glycoprotein expression and emamectin benzoate resistance on salmon farms in the Bay of Fundy, New Brunswick, Canada. *Pest Manag Sci* 70, 905-914.
- Ikemura, K., Iwamoto, T., Okuda, M., 2014. MicroRNAs as regulators of drug transporters, drug-metabolizing enzymes, and tight junctions: implication for intestinal barrier function. *Pharmacol Ther* 143, 217-224.
- Ikemura, K., Yamamoto, M., Miyazaki, S., Mizutani, H., Iwamoto, T., Okuda, M., 2013. MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells. *Mol Pharmacol* 83, 399-405.
- Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S., Sugimoto, Y., 2005. Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer Res* 65, 596-604.
- Jackson, F., Coop, R.L., Jackson, E., Scott, E.W., Russel, A.J., 1992. Multiple anthelmintic resistant nematodes in goats. *Vet Rec* 130, 210-211.
- Jaeger, W., 2009. Classical resistance mechanisms. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47, 46-48.
- James, C.E., Davey, M.W., 2009. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 39, 213-220.
- Janssen, I.J., Krucken, J., Demeler, J., Basiaga, M., Kornas, S., von Samson-Himmelstjerna, G., 2013a. Genetic Variants and Increased Expression of *Parascaris equorum* P-glycoprotein-11 in Populations with Decreased Ivermectin Susceptibility. *PLoS One* 8, e61635.

- Janssen, I.J., Krucken, J., Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2013b. *Caenorhabditis elegans*: modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains. *Exp Parasitol* 134, 171-177.
- Jiang, Y., Jin, J., Iakova, P., Hernandez, J.C., Jawanmardi, N., Sullivan, E., Guo, G.L., Timchenko, N.A., Darlington, G.J., 2013. Farnesoid X receptor directly regulates xenobiotic detoxification genes in the long-lived Little mice. *Mech Ageing Dev* 134, 407-415.
- Jiao, X., Zhao, L., Ma, M., Bai, X., He, M., Yan, Y., Wang, Y., Chen, Q., Zhao, X., Zhou, M., Cui, Z., Zheng, Z., Wang, E., Wei, M., 2013. MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Breast Cancer Res Treat* 139, 717-730.
- Jigorel, E., Le Vee, M., Boursier-Neyret, C., Parmentier, Y., Fardel, O., 2006. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 34, 1756-1763.
- Jin, L., Feng, X., Rong, H., Pan, Z., Inaba, Y., Qiu, L., Zheng, W., Lin, S., Wang, R., Wang, Z., Wang, S., Liu, H., Li, S., Xie, W., Li, Y., 2013. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nat Commun* 4, 1937.
- Johnson, D.R., Klaassen, C.D., 2002. Regulation of rat multidrug resistance protein 2 by classes of prototypical microsomal enzyme inducers that activate distinct transcription pathways. *Toxicol Sci* 67, 182-189.
- Jones, L.M., Rayson, S.J., Flemming, A.J., Urwin, P.E., 2013. Adaptive and Specialised Transcriptional Responses to Xenobiotic Stress in *Caenorhabditis elegans* Are Regulated by Nuclear Hormone Receptors. *PLoS One* 8, e69956.
- Jung, D., Mangelsdorf, D.J., Meyer, U.A., 2006. Pregnane X receptor is a target of farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 281, 19081-19091.
- Kaplan, R.M., Klei, T.R., Lyons, E.T., Lester, G., Courtney, C.H., French, D.D., Tolliver, S.C., Vidyashankar, A.N., Zhao, Y., 2004. Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *J Am Vet Med Assoc* 225, 903-910.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 186, 70-78.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., Howell, S.B., Neiss, J.M., Williamson, L.H., Terrill, T.H., 2007. A novel approach for combining the use of in vitro and in vivo data to measure and detect emerging moxidectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats. *Int J Parasitol* 37, 795-804.
- Kast, H.R., Goodwin, B., Tarr, P.T., Jones, S.A., Anisfeld, A.M., Stoltz, C.M., Tontonoz, P., Kliewer, S., Willson, T.M., Edwards, P.A., 2002. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 277, 2908-2915.
- Kerboeuf, D., Aycardi, J., 1999. Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity. *Parasitol Res* 85, 713-718.
- Kiki-Mvouaka, S., Menez, C., Borin, C., Lyazrhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J., Collet, X., Alvinerie, M., Lespine, A., 2010. Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: A comparison between ivermectin, eprinomectin, and moxidectin in mice. *Drug Metab Dispos* 38, 573-580.
- Kim, Y.K., Kim, N.H., Hwang, J.W., Song, Y.J., Park, Y.S., Seo, D.W., Lee, H.Y., Choi, W.S., Han, J.W., Kim, S.N., 2008. Histone deacetylase inhibitor apicidin-mediated drug resistance: involvement of P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 959-964.
- Kitagawa, S., Nabekura, T., Kamiyama, S., 2004. Inhibition of P-glycoprotein function by tea catechins in KB-C2 cells. *J Pharm Pharmacol* 56, 1001-1005.
- Klein, C., Wustefeld, T., Assmus, U., Roskams, T., Rose-John, S., Muller, M., Manns, M.P., Ernst, M., Trautwein, C., 2005. The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J Clin Invest* 115, 860-869.

- Koturbash, I., Beland, F.A., Pogribny, I.P., 2012. Role of microRNAs in the regulation of drug metabolizing and transporting genes and the response to environmental toxicants. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 8, 597-606.
- Kotze, A.C., Ruffell, A.P., Knox, M.R., Kelly, G.A., 2014. Relative potency of macrocyclic lactones in in vitro assays with larvae of susceptible and drug-resistant Australian isolates of *Haemonchus contortus* and *H. placei*. *Vet Parasitol* 203, 294-302.
- Kumar, K.K., Priyanka, L., Gnananath, K., Babu, P.R., Sujatha, S., 2014. Pharmacokinetic drug interactions between apigenin, rutin and paclitaxel mediated by P-glycoprotein in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*.
- Kurose, K., Saeki, M., Tohkin, M., Hasegawa, R., 2008. Thyroid hormone receptor mediates human MDR1 gene expression-Identification of the response region essential for gene expression. *Arch Biochem Biophys* 474, 82-90.
- Kwa, M.S., Veenstra, J.G., Roos, M.H., 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* 63, 299-303.
- Kwei, G.Y., Alvaro, R.F., Chen, Q., Jenkins, H.J., Hop, C.E., Keohane, C.A., Ly, V.T., Strauss, J.R., Wang, R.W., Wang, Z., Pippert, T.R., Umbenhauer, D.R., 1999. Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in *mdr1a* P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 27, 581-587.
- Laffont, C.M., Toutain, P.L., Alvinerie, M., Bousquet-Melou, A., 2002. Intestinal secretion is a major route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metab Dispos* 30, 626-630.
- Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A., Tsai, I.J., Beech, R.N., Redman, E., Holroyd, N., Bartley, D.J., Beasley, H., Britton, C., Curran, D., Devaney, E., Gilabert, A., Hunt, M., Jackson, F., Johnston, S.L., Kryukov, I., Li, K., Morrison, A.A., Reid, A.J., Sargison, N., Saunders, G.I., Wasmuth, J.D., Wolstenholme, A., Berriman, M., Gilleard, J.S., Cotton, J.A., 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biol* 14, R88.
- Laing, S.T., Ivens, A., Butler, V., Ravikumar, S.P., Laing, R., Woods, D.J., Gilleard, J.S., 2012. The transcriptional response of *Caenorhabditis elegans* to Ivermectin exposure identifies novel genes involved in the response to reduced food intake. *PLoS One* 7, e31367.
- Le Jambre, L.F., Lenane, I.J., Wardrop, A.J., 1999. A hybridisation technique to identify anthelmintic resistance genes in *Haemonchus*. *Int J Parasitol* 29, 1979-1985.
- Lee, C.H., 2001. Induction of P-glycoprotein mRNA transcripts by cycloheximide in animal tissues: evidence that class I Pgp is transcriptionally regulated whereas class II Pgp is post-transcriptionally regulated. *Mol Cell Biochem* 216, 103-110.
- Lemmen, J., Tozakidis, I.E., Bele, P., Galla, H.J., 2013a. Constitutive androstane receptor upregulates *Abcb1* and *Abcg2* at the blood-brain barrier after CITCO activation. *Brain Res* 1501, 68-80.
- Lemmen, J., Tozakidis, I.E., Galla, H.J., 2013b. Pregnane X receptor upregulates ABC-transporter *Abcg2* and *Abcb1* at the blood-brain barrier. *Brain Res* 1491, 1-13.
- Lespine, A., Alvinerie, M., Vercruysse, J., Prichard, R.K., Geldhof, P., 2008. ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends Parasitol* 24, 293-298.
- Lespine, A., Dupuy, J., Orłowski, S., Nagy, T., Glavinas, H., Krajcsi, P., Alvinerie, M., 2006. Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem Biol Interact* 159, 169-179.
- Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orłowski, S., Alvinerie, M., 2007. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship. *Eur J Pharm Sci* 30, 84-94.
- Lespine A., M.C., Bourguinat C., Prichard R.K., 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: "Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *Int J Parasitol* 2, 58-75

- Li, J., Ebata, A., Dong, Y., Rizki, G., Iwata, T., Lee, S.S., 2008. *Caenorhabditis elegans* HCF-1 functions in longevity maintenance as a DAF-16 regulator. *PLoS Biol* 6, e233.
- Li, L., Dong, H., Song, E., Xu, X., Liu, L., Song, Y., 2014a. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling. *Chem Biol Interact* 209, 56-67.
- Li, M., You, T.Z., Zhu, W.J., Qu, J.P., Liu, C., Zhao, B., Xu, S.W., Li, S., 2013. Antioxidant response and histopathological changes in brain tissue of pigeon exposed to avermectin. *Ecotoxicology* 22, 1241-1254.
- Li, X., Pan, Y.Z., Seigel, G.M., Hu, Z.H., Huang, M., Yu, A.M., 2011. Breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2 regulatory microRNAs (hsa-miR-328, -519c and -520h) and their differential expression in stem-like ABCG2+ cancer cells. *Biochem Pharmacol* 81, 783-792.
- Li, Y., Huang, L., Zeng, X., Zhong, G., Ying, M., Huang, M., Bi, H., 2014b. Down-regulation of P-gp expression and function after Mulberroside A treatment: potential role of protein kinase C and NF-kappa B. *Chem Biol Interact* 213, 44-50.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A., Lanusse, C., 2002. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 25, 111-120.
- Limtrakul, P., Khantamat, O., Pintha, K., 2005. Inhibition of P-glycoprotein function and expression by kaempferol and quercetin. *J Chemother* 17, 86-95.
- Lindblom, T.H., Dodd, A.K., 2006. Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305, 720-730.
- Lindblom, T.H., Pierce, G.J., Sluder, A.E., 2001. A *C. elegans* orphan nuclear receptor contributes to xenobiotic resistance. *Curr Biol* 11, 864-868.
- Liu, C., Li, M., Cao, Y., Qu, J.P., Zhang, Z.W., Xu, S.W., Li, S., 2014. Effects of avermectin on immune function and oxidative stress in the pigeon spleen. *Chem Biol Interact* 210, 43-50.
- Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Ballent, M., Mate, L., Lanusse, C., Lifschitz, A., 2013. Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3, 20-27.
- Luo, L., Sun, Y.J., Wu, Y.J., 2013a. Abamectin resistance in *Drosophila* is related to increased expression of P-glycoprotein via the dEGFR and dAkt pathways. *Insect Biochem Mol Biol* 43, 627-634.
- Luo, L., Sun, Y.J., Yang, L., Huang, S., Wu, Y.J., 2013b. Avermectin induces P-glycoprotein expression in S2 cells via the calcium/calmodulin/NF-kappaB pathway. *Chem Biol Interact* 203, 430-439.
- Lustigman, S., Prichard, R.K., Gazzinelli, A., Grant, W.N., Boatman, B.A., McCarthy, J.S., Basanez, M.G., 2012. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiases. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1582.
- Maglich, J.M., Stoltz, C.M., Goodwin, B., Hawkins-Brown, D., Moore, J.T., Kliewer, S.A., 2002. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 62, 638-646.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96, 47-56.
- Maher, J.M., Cheng, X., Slitt, A.L., Dieter, M.Z., Klaassen, C.D., 2005. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 33, 956-962.
- Martinez-Valladares, M., Geldhof, P., Jonsson, N., Rojo-Vazquez, F.A., Skuce, P., 2012. *Teladorsagia circumcincta*: Molecular characterisation of the avr-14B subunit and its relatively minor role in ivermectin resistance. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2, 154-161.
- McArthur, C.L., Bartley, D.J., Shaw, D.J., Matthews, J.B., 2011. Assessment of ivermectin efficacy against gastrointestinal nematodes in cattle on four Scottish farms. *Vet Rec* 169, 658.

- McCarthy, T.C., Li, X., Sinal, C.J., 2005. Vitamin D receptor-dependent regulation of colon multidrug resistance-associated protein 3 gene expression by bile acids. *J Biol Chem* 280, 23232-23242.
- McCavera, S., Walsh, T.K., Wolstenholme, A.J., 2007. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. *Parasitology* 134, 1111-1121.
- McKellar, Q.A., Benchaoui, H.A., 1996. Avermectins and milbemycins. *J Vet Pharmacol Ther* 19, 331-351.
- McKellar, Q.A., Gokbulut, C., 2012. Pharmacokinetic features of the antiparasitic macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol* 13, 888-911.
- McKenna, P.B., 1997. Anthelmintic treatment and the suppression of egg production in gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: fact or fallacy? *N Z Vet J* 45, 173-177.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M., Cantor, G.H., 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11, 727-733.
- Ménez, C., Mselli-Lakhal, L., Foucaud-Vignault, M., Balaguer, P., Alvinerie, M., Lespine, A., 2012a. Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. *Biochem Pharmacol* 83, 269-278.
- Ménez, C., Mselli-Lakhal, L., Foucaud-Vignault, M., Balaguer, P., Alvinerie, M., Lespine, A., 2012b. Ivermectin induces P-glycoprotein expression and function through mRNA stabilization in murine hepatocyte cell line. *Biochem Pharmacol* 83, 269-278.
- Menzel, R., Rodel, M., Kulas, J., Steinberg, C.E., 2005. CYP35: xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Arch Biochem Biophys* 438, 93-102.
- Miao, J., Fang, S., Bae, Y., Kemper, J.K., 2006. Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1 α . *J Biol Chem* 281, 14537-14546.
- Michalopoulos, G.K., 2007. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213, 286-300.
- Min, G., Kim, H., Bae, Y., Petz, L., Kemper, J.K., 2002. Inhibitory cross-talk between estrogen receptor (ER) and constitutively activated androstane receptor (CAR). CAR inhibits ER-mediated signaling pathway by squelching p160 coactivators. *J Biol Chem* 277, 34626-34633.
- Misra, J.R., Horner, M.A., Lam, G., Thummel, C.S., 2014. Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes Dev* 25, 1796-1806.
- Moffit, J.S., Aleksunes, L.M., Maher, J.M., Scheffer, G.L., Klaassen, C.D., Manautou, J.E., 2006. Induction of hepatic transporters multidrug resistance-associated proteins (Mrp) 3 and 4 by clofibrate is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Pharmacol Exp Ther* 317, 537-545.
- Molento, M.B., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Lanusse, C., Prichard, R., 2004. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitol Res* 92, 121-127.
- Morris, M.E., Zhang, S., 2006. Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci* 78, 2116-2130.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Motola, D.L., Cummins, C.L., Rottiers, V., Sharma, K.K., Li, T., Li, Y., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Auchus, R.J., Antebi, A., Mangelsdorf, D.J., 2006. Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*. *Cell* 124, 1209-1223.
- Nakanishi, T., Ross, D.D., 2012. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer* 31, 73-99.
- Namani, A., Li, Y., Wang, X.J., Tang, X., 2014. Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: implications for cancer. *Biochim Biophys Acta* 1843, 1875-1885.

- Narang, V.S., Fraga, C., Kumar, N., Shen, J., Throm, S., Stewart, C.F., Waters, C.M., 2008. Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C440-450.
- Nishimura, M., Koeda, A., Suzuki, E., Kawano, Y., Nakayama, M., Satoh, T., Narimatsu, S., Naito, S., 2006. Regulation of mRNA expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 21, 297-307.
- Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Naito, S., Hiraoka, I., 2002. Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 122, 339-361.
- Njue, A.I., Prichard, R.K., 2004. Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*. *Parasitology* 129, 741-751.
- Ogawa, K., Suzuki, H., Hirohashi, T., Ishikawa, T., Meier, P.J., Hirose, K., Akizawa, T., Yoshioka, M., Sugiyama, Y., 2000. Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G438-446.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550.
- Pan, Y.Z., Morris, M.E., Yu, A.M., 2009. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 75, 1374-1379.
- Pan, Y.Z., Zhou, A., Hu, Z., Yu, A.M., 2013. Small nucleolar RNA-derived microRNA hsa-miR-1291 modulates cellular drug disposition through direct targeting of ABC transporter ABCC1. *Drug Metab Dispos* 41, 1744-1751.
- Pascussi, J.M., Busson-Le Coniat, M., Maurel, P., Vilarem, M.J., 2003. Transcriptional analysis of the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (NR1I3) gene promoter: identification of a distal glucocorticoid response element. *Mol Endocrinol* 17, 42-55.
- Pascussi, J.M., Drocourt, L., Fabre, J.M., Maurel, P., Vilarem, M.J., 2000. Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* 58, 361-372.
- Pierce, J.W., Schoenleber, R., Jesmok, G., Best, J., Moore, S.A., Collins, T., Gerritsen, M.E., 1997. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 272, 21096-21103.
- Pohl, P.C., Carvalho, D.D., Daffre, S., Vaz Ida, S., Jr., Masuda, A., 2014. In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism. *Vet Parasitol* 204, 316-322.
- Pohl, P.C., Klafke, G.M., Carvalho, D.D., Martins, J.R., Daffre, S., da Silva Vaz, I., Jr., Masuda, A., 2011. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J Parasitol* 41, 1323-1333.
- Polvani, S., Tarocchi, M., Tempesti, S., Galli, A., 2014. Nuclear receptors and pathogenesis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 20, 12062-12081.
- Poole, C.B., Davis, P.J., Jin, J., McReynolds, L.A., 2010. Cloning and bioinformatic identification of small RNAs in the filarial nematode, *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol* 169, 87-94.
- Pouliot, J.F., L'Heureux, F., Liu, Z., Prichard, R.K., Georges, E., 1997. Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochem Pharmacol* 53, 17-25.
- Prichard, R., Menez, C., Lespine, A., 2012. Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2, 134-153.

- Przybysz, A.J., Choe, K.P., Roberts, L.J., Strange, K., 2009. Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone. *Mech Ageing Dev* 130, 357-369.
- Qadri, I., Hu, L.J., Iwahashi, M., Al-Zuabi, S., Quattrochi, L.C., Simon, F.R., 2009. Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2). *Toxicol Appl Pharmacol* 234, 281-292.
- Qadri, I., Iwahashi, M., Kullak-Ublick, G.A., Simon, F.R., 2006. Hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 and HNF4 mediate hepatic multidrug resistance protein 2 up-regulation during hepatitis C virus gene expression. *Mol Pharmacol* 70, 627-636.
- Qatanani, M., Zhang, J., Moore, D.D., 2005. Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* 146, 995-1002.
- Ravishankar, D., Rajora, A.K., Greco, F., Osborn, H.M., 2013. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2821-2831.
- Reichert, K., Menzel, R., 2005. Expression profiling of five different xenobiotics using a *Caenorhabditis elegans* whole genome microarray. *Chemosphere* 61, 229-237.
- Rigalli, J.P., Ruiz, M.L., Perdomo, V.G., Villanueva, S.S., Mottino, A.D., Catania, V.A., 2011. Pregnane X receptor mediates the induction of P-glycoprotein by spironolactone in HepG2 cells. *Toxicology* 285, 18-24.
- Rizki, G., Iwata, T.N., Li, J., Riedel, C.G., Picard, C.L., Jan, M., Murphy, C.T., Lee, S.S., 2011. The evolutionarily conserved longevity determinants HCF-1 and SIR-2.1/SIRT1 collaborate to regulate DAF-16/FOXO. *PLoS Genet* 7, e1002235.
- Rizki, G., Picard, C.L., Pereyra, C., Lee, S.S., 2012. Host cell factor 1 inhibits SKN-1 to modulate oxidative stress responses in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 11, 717-721.
- Robinson-Rechavi, M., Maina, C.V., Gissendanner, C.R., Laudet, V., Sluder, A., 2005. Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes. *J Mol Evol* 60, 577-586.
- Rodrigues, A.C., Curi, R., Hirata, M.H., Hirata, R.D., 2009. Decreased ABCB1 mRNA expression induced by atorvastatin results from enhanced mRNA degradation in HepG2 cells. *Eur J Pharm Sci* 37, 486-491.
- Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., Glass, C.K., 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20, 1405-1428.
- Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J.F., Drag, M., Soll, M., Alvinerie, M., Pineau, T., 2003. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol* 460, 85-91.
- Rushmore, T.H., Kong, A.N., 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 3, 481-490.
- Safe, S., Wormke, M., 2003. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 16, 807-816.
- Saint-Pol, J., Candela, P., Boucau, M.C., Fenart, L., Gosselet, F., 2013. Oxysterols decrease apical-to-basolateral transport of Ass peptides via an ABCB1-mediated process in an in vitro Blood-brain barrier model constituted of bovine brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 1517, 1-15.
- Sangster, N.C., Bannan, S.C., Weiss, A.S., Nulf, S.C., Klein, R.D., Geary, T.G., 1999. *Haemonchus contortus*: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from P-glycoproteins. *Exp Parasitol* 91, 250-257.
- Sargison, N.D., Jackson, F., Bartley, D.J., Wilson, D.J., Stenhouse, L.J., Penny, C.D., 2007. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Vet Parasitol* 145, 65-76.

- Sargison, N.D., Jackson, F., Wilson, D.J., Bartley, D.J., Penny, C.D., Gilleard, J.S., 2010. Characterisation of milbemycin-, avermectin-, imidazothiazole- and benzimidazole-resistant *Teladorsagia circumcincta* from a sheep flock. *Vet Rec* 166, 681-686.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P., et al., 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491-502.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97, 2517-2524.
- Schuetz, E.G., Strom, S., Yasuda, K., Lecureur, V., Assem, M., Brimer, C., Lamba, J., Kim, R.B., Ramachandran, V., Komoroski, B.J., Venkataramanan, R., Cai, H., Sinal, C.J., Gonzalez, F.J., Schuetz, J.D., 2001. Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol Chem* 276, 39411-39418.
- Scott, E.W., Baxter, P., Armour, J., 1991. Fecundity of anthelmintic resistant adult *Haemonchus contortus* after exposure to ivermectin or benzimidazoles in vivo. *Res Vet Sci* 50, 247-249.
- Sesink, A.L., Arts, I.C., de Boer, V.C., Breedveld, P., Schellens, J.H., Hollman, P.C., Russel, F.G., 2005. Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol Pharmacol* 67, 1999-2006.
- Sharom, F.J., 2008. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* 9, 105-127.
- Sheps, J.A., Ralph, S., Zhao, Z., Baillie, D.L., Ling, V., 2004. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol* 5, R15.
- Shoop, W.L., Ostlind, D.A., Rohrer, S.P., Mickle, G., Haines, H.W., Michael, B.F., Mrozik, H., Fisher, M.H., 1995. Avermectins and milbemycins against *Fasciola hepatica*: in vivo drug efficacy and in vitro receptor binding. *Int J Parasitol* 25, 923-927.
- Sike, A., Nagy, E., Vedelek, B., Pusztai, D., Szeremy, P., Venetianer, A., Boros, I.M., 2014. mRNA levels of related *Abcb* genes change opposite to each other upon histone deacetylase inhibition in drug-resistant rat hepatoma cells. *PLoS One* 9, e84915.
- Simoes, M.C., Lee, J., Djikeng, A., Cerqueira, G.C., Zerlotini, A., da Silva-Pereira, R.A., Dalby, A.R., LoVerde, P., El-Sayed, N.M., Oliveira, G., 2011. Identification of *Schistosoma mansoni* microRNAs. *BMC Genomics* 12, 47.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Steinbrecher, K.A., Wilson, W., 3rd, Cogswell, P.C., Baldwin, A.S., 2005. Glycogen synthase kinase 3beta functions to specify gene-specific, NF-kappaB-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 25, 8444-8455.
- Stejskalova, L., Vecerova, L., Perez, L.M., Vrzal, R., Dvorak, Z., Nachtigal, P., Pavek, P., 2011. Aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon nuclear translocator expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures. *Toxicol Sci* 123, 26-36.
- Stolarczyk, E.I., Reiling, C.J., Paumi, C.M., 2011. Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases. *Curr Pharm Biotechnol* 12, 621-635.
- Sui, H., Fan, Z.Z., Li, Q., 2012. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells. *J Int Med Res* 40, 426-435.
- Szakacs, G., Varadi, A., Ozvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today* 13, 379-393.

- Szatmari, I., Vamosi, G., Brazda, P., Balint, B.L., Benko, S., Szeles, L., Jeney, V., Ozvegy-Laczka, C., Szanto, A., Barta, E., Balla, J., Sarkadi, B., Nagy, L., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J Biol Chem* 281, 23812-23823.
- Taub, R., 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 836-847.
- Teng, S., Jekerle, V., Piquette-Miller, M., 2003. Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug Metab Dispos* 31, 1296-1299.
- Tien, E.S., Matsui, K., Moore, R., Negishi, M., 2007. The nuclear receptor constitutively active/androstane receptor regulates type 1 deiodinase and thyroid hormone activity in the regenerating mouse liver. *J Pharmacol Exp Ther* 320, 307-313.
- Tribble, N.D., Burka, J.F., Kibenge, F.S., 2007. Evidence for changes in the transcription levels of two putative P-glycoprotein genes in sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) in response to emamectin benzoate exposure. *Mol Biochem Parasitol* 153, 59-65.
- Turrini, E., Haenisch, S., Laechelt, S., Diewock, T., Bruhn, O., Cascorbi, I., 2012. MicroRNA profiling in K-562 cells under imatinib treatment: influence of miR-212 and miR-328 on ABCG2 expression. *Pharmacogenet Genomics* 22, 198-205.
- Urdaneta-Marquez, L., Bae, S.H., Janukavicius, P., Beech, R., Dent, J., Prichard, R., 2014. A dyf-7 haplotype causes sensory neuron defects and is associated with macrocyclic lactone resistance worldwide in the nematode parasite *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol*.
- Van Gilst, M., Gissendanner, C.R., Sluder, A.E., 2002. Diversity and function of orphan nuclear receptors in nematodes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 12, 65-88.
- van Wyk, J.A., Malan, F.S., 1988. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, radoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet Rec* 123, 226-228.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W.J., McCarthy, J.S., Skuce, P.J., 2007. Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology* 134, 1077-1086.
- Walker, G., Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R., Gems, D., 2005. Dietary restriction in *C. elegans*: from rate-of-living effects to nutrient sensing pathways. *Mech Ageing Dev* 126, 929-937.
- Wang, H., Lee, E.W., Zhou, L., Leung, P.C., Ross, D.D., Unadkat, J.D., Mao, Q., 2008. Progesterone receptor (PR) isoforms PRA and PRB differentially regulate expression of the breast cancer resistance protein in human placental choriocarcinoma BeWo cells. *Mol Pharmacol* 73, 845-854.
- Wang, L., Wang, C., Peng, J., Liu, Q., Meng, Q., Sun, H., Huo, X., Sun, P., Yang, X., Zhen, Y., Liu, K., 2014a. Dioscin enhances methotrexate absorption by down-regulating MDR1 in vitro and in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 277, 146-154.
- Wang, Q.P., Wang, Y., Wang, X.D., Mo, X.M., Gu, J., Lu, Z.Y., Pan, Z.L., Zhu, Y.X., 2013a. Survivin up-regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP) through attenuating the suppression of p53 on NF-kappaB expression in MCF-7/5-FU cells. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 2036-2044.
- Wang, W., McLeod, H.L., Cassidy, J., 2003. Disulfiram-mediated inhibition of NF-kappaB activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 104, 504-511.
- Wang, X., Campos, C.R., Peart, J.C., Smith, L.K., Boni, J.L., Cannon, R.E., Miller, D.S., 2014b. Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers. *J Neurosci* 34, 8585-8593.
- Wang, Y.M., Lin, W., Chai, S.C., Wu, J., Ong, S.S., Schuetz, E.G., Chen, T., 2013b. Piperine activates human pregnane X receptor to induce the expression of cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1. *Toxicol Appl Pharmacol* 272, 96-107.
- Webster, C.M., Deline, M.L., Watts, J.L., 2013. Stress response pathways protect germ cells from omega-6 polyunsaturated fatty acid-mediated toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 373, 14-25.

- Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K.M., Kaplan, R.M., Wolstenholme, A.J., 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 180, 99-105.
- Wimmer, R., Hohenester, S., Pusl, T., Denk, G.U., Rust, C., Beuers, U., 2008. Tauroursodeoxycholic acid exerts anticholestatic effects by a cooperative cPKC α -/PKA-dependent mechanism in rat liver. *Gut* 57, 1448-1454.
- Winter, A.D., Weir, W., Hunt, M., Berriman, M., Gilleard, J.S., Devaney, E., Britton, C., 2012. Diversity in parasitic nematode genomes: the microRNAs of *Brugia pahangi* and *Haemonchus contortus* are largely novel. *BMC Genomics* 13, 4.
- Wolstenholme, A.J., Rogers, A.T., 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 131 Suppl, S85-95.
- Wruck, C.J., Streetz, K., Pavic, G., Gotz, M.E., Tohidnezhad, M., Brandenburg, L.O., Varoga, D., Eickelberg, O., Herdegen, T., Trautwein, C., Cha, K., Kan, Y.W., Pufe, T., 2011. Nrf2 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL-6 promoter. *J Biol Chem* 286, 4493-4499.
- Wu, W., LoVerde, P.T., 2011. Nuclear hormone receptors in parasitic helminths. *Mol Cell Endocrinol* 334, 56-66.
- Wu, X., Zhang, X., Sun, L., Zhang, H., Li, L., Wang, X., Li, W., Su, P., Hu, J., Gao, P., Zhou, G., 2013. Progesterone negatively regulates BCRP in progesterone receptor-positive human breast cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 32, 344-354.
- Xie, Y., Xu, K., Linn, D.E., Yang, X., Guo, Z., Shimelis, H., Nakanishi, T., Ross, D.D., Chen, H., Fazli, L., Gleave, M.E., Qiu, Y., 2008. The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 283, 3349-3356.
- Xu, K., Liang, X., Shen, K., Cui, D., Zheng, Y., Xu, J., Fan, Z., Qiu, Y., Li, Q., Ni, L., Liu, J., 2012. miR-297 modulates multidrug resistance in human colorectal carcinoma by down-regulating MRP-2. *Biochem J* 446, 291-300.
- Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R., Prichard, R., 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol* 91, 327-335.
- Yague, E., Armesilla, A.L., Harrison, G., Elliott, J., Sardini, A., Higgins, C.F., Raguz, S., 2003. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J Biol Chem* 278, 10344-10352.
- Yan, R., Urdaneta-Marquez, L., Keller, K., James, C.E., Davey, M.W., Prichard, R.K., 2012. The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Vet Parasitol* 190, 519-529.
- Yang, L., Li, N., Wang, H., Jia, X., Wang, X., Luo, J., 2012. Altered microRNA expression in cisplatin-resistant ovarian cancer cells and upregulation of miR-130a associated with MDR1/P-glycoprotein-mediated drug resistance. *Oncol Rep* 28, 592-600.
- Yoon, K.S., Strycharz, J.P., Baek, J.H., Sun, W., Kim, J.H., Kang, J.S., Pittendrigh, B.R., Lee, S.H., Clark, J.M., 2011. Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin over-transcribes detoxification genes involved in tolerance. *Insect Mol Biol* 20, 687-699.
- Yu, A.M., 2009. Role of microRNAs in the regulation of drug metabolism and disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5, 1513-1528.
- Zeng, Z., Andrew, N.W., Arison, B.H., Luffer-Atlas, D., Wang, R.W., 1998. Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. *Xenobiotica* 28, 313-321.
- Zeng, Z., Andrew, N.W., Green-Erwin, M.L., Halley, B.A., 1996. Fate of 4"-epiacetylamino-4"-deoxyivermectin B1 in rats. *Drug Metab Dispos* 24, 572-578.
- Zeng, Z., Andrew, N.W., Halley, B.A., 1997. Identification of cytochrome P4503A as the major enzyme sub-family responsible for the metabolism of 22,23-dihydro-13-O-[(2-

- methoxyethoxy)methyl]-avermectin B1 aglycone by rat liver microsomes. *Xenobiotica* 27, 985-994.
- Zhang, S., Yang, X., Morris, M.E., 2004. Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol Pharmacol* 65, 1208-1216.
- Zhang, X., Li, J., Chen, C., Ci, X., Yu, Q., Zhang, X., Deng, X., 2010. Protective effect of abamectin on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 25, 700-707.
- Zhang, X., Song, J., Shi, X., Miao, S., Li, Y., Wen, A., 2013. Absorption and metabolism characteristics of rutin in Caco-2 cells. *ScientificWorldJournal* 2013, 382350.
- Zhang, X., Song, Y., Ci, X., An, N., Ju, Y., Li, H., Wang, X., Han, C., Cui, J., Deng, X., 2008. Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice. *Inflamm Res* 57, 524-529.
- Zhao, Z., Sheps, J.A., Ling, V., Fang, L.L., Baillie, D.L., 2004. Expression analysis of ABC transporters reveals differential functions of tandemly duplicated genes in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 344, 409-417.
- Zhong, R.Z., Li, H.Y., Sun, H.X., Zhou, D.W., 2014. Effects of supplementation with dietary green tea polyphenols on parasite resistance and acute phase protein response to *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Vet Parasitol* 205, 199-207.
- Zhou, G., Kuo, M.T., 1997. NF-kappaB-mediated induction of *mdr1b* expression by insulin in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 272, 15174-15183.
- Zhou, J., Zhai, Y., Mu, Y., Gong, H., Uppal, H., Toma, D., Ren, S., Evans, R.M., Xie, W., 2006. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J Biol Chem* 281, 15013-15020.
- Zhu, W.J., Li, M., Liu, C., Qu, J.P., Min, Y.H., Xu, S.W., Li, S., 2013. Avermectin induced liver injury in pigeon: mechanisms of apoptosis and oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 98, 74-81.
- Zordoky, B.N., El-Kadi, A.O., 2009. Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Curr Drug Metab* 10, 164-178.

CONCLUSION

Cette thèse avait comme objectif de mieux comprendre les interactions entre les lactones macrocycliques antiparasitaires et les enzymes des systèmes de détoxification impliquées dans leur devenir chez l'organisme hôte et dans le développement de résistance chez le nématode. Des inhibiteurs des transporteurs ABC pour potentialiser l'efficacité de l'ivermectine ont aussi été recherchés.

Dans l'ensemble, ce travail de thèse montre que l'ivermectine induit des mécanismes responsables d'une adaptation des organismes. Une des stratégies pour étudier l'implication des transporteurs dans la résistance aux LMs chez les nématodes, serait d'éteindre leur surexpression. Dans la mesure où cette surexpression concerne plusieurs transporteurs ABC, il faut envisager des stratégies qui permettent d'en éteindre plusieurs simultanément. Nos résultats montrent que les facteurs de transcriptions sont au cœur de ces adaptations : NF- κ B et NRF2 chez l'hôte et *nhr-a* chez le nématode. Un inhibiteur spécifique ciblant les mécanismes de régulation des gènes de détoxification chez le nématode parasite tels que les facteurs de transcriptions, permettrait d'éteindre plusieurs transporteurs ABC à la fois. Idéalement, un antagoniste spécifique d'un facteur de transcription du nématode pourrait être proposé comme agent thérapeutique afin de potentialiser l'efficacité de l'ivermectine. L'utilisation de tels antagonistes est déjà proposée dans le cadre de réversion de résistances de tumeurs à certains médicaments, où la surexpression des transporteurs ABC multidrogues est avérée (Chen et al., 2012). Cette stratégie pourrait être utilisée en médecine vétérinaire lors de résistance avérée de certains parasites à l'ivermectine. Enfin, des études *in vivo*, chez des hôtes parasités par des nématodes résistants à l'ivermectine ainsi qu'aux autres lactones macrocycliques anthelminthiques, nous paraît une perspective de recherche primordiale. Ainsi, ces études nous permettront à terme de proposer des stratégies basées sur l'association d'inhibiteurs des systèmes de détoxification spécifiques des nématodes avec le médicament substrat. Ceci permettrait d'améliorer la performance des LMs déjà existantes dans le but d'éviter et de limiter le développement de résistances chez les animaux d'élevage.

TITLE : Impact of ivermectin on xenobiotic detoxification systems: regulatins in host and nematode.

SUMMARY: Infections with gastrointestinal nematodes (GINs) in livestock leads to major losses in production and consequently impact economically farmers. Their intensive use has led to widespread anthelmintic resistance which is nowadays the main threat on the sustainable control of GINs in livestock. The development of new anthelmintic is limited due to the cost of such process. Then, the challenge remains in optimizing the use of existing molecules. Therefore, it is urgent to limit and control MLs resistance in order to extend their efficacy and to avoid therapeutic failure. Resistance mechanisms remain to be elucidated. In that context, we investigated regulatory mechanism of detoxification systems of ivermectin implicated in therapeutic efficacy in host and resistance development in nematode. Therapeutic combinations of ivermectin with flavonoïds have been evaluated to potentiate its efficacy in nematode. We showed that repeated oral administration of ivermectin induced gene expression encoding some ABC efflux transporters and cytochromes involved in its metabolism. Compared with single administration, repeated ivermectin administration lowered plasma, liver and intestine drug concentration, while increasing main metabolite content in plasma and intestine. We have also shown that nuclear receptor nhr-a was important for ivermectin tolerance and ivermectin development of resistance in *C. elegans*. Finally, we demonstrated the ability of the flavonoïd phloretin to potentiate ivermectin efficacy in the nematode *C. elegans*. Taken together, these data suggest that induction of detoxification systems impact on ivermectin distribution and targeting their regulation could be an appropriate strategy to potentiate ivermectin efficacy in host and to reverse resistance in nematode

KEY WORDS : macrocyclic lactone, ivermectin, ABC efflux transporters, cytochromes, liver, intestine, mice, *Caenorhabditis elegans*, nuclear receptors, flavonoïds, ivermectin aglycone, resistance.

AUTEUR : Mélanie ALBERICH

TITRE : Impact de l'ivermectine sur les systèmes de détoxification des xénobiotiques : régulations chez l'hôte et chez le nématode.

DIRECTEURS DE THESE : Madame le Docteur Anne LESPINE
Madame le Docteur Cécile MENEZ-BERLIOZ

RESUME : Les infections par les nématodes gastro-intestinaux entraînent des baisses en productions animales et des pertes économiques majeures pour les éleveurs. Les lactones macrocycliques (LMs) sont parmi les antiparasitaires les plus utilisés dans la lutte contre les nématodes gastro-intestinaux en médecine vétérinaire. De part une utilisation intensive, des résistances aux LMs chez les parasites gastro-intestinaux se sont développées au sein des élevages du monde entier mettant en péril l'efficacité thérapeutique de ces molécules. Par ailleurs, le développement de nouveaux antiparasitaires est limité. Ainsi, un des enjeux pour assurer le contrôle de ces parasites est de ralentir les phénomènes de résistance aux LMs afin de prolonger leur efficacité. Le succès d'une telle stratégie repose sur les connaissances précises des mécanismes impliqués dans la résistance. Parmi eux, la modulation des systèmes de détoxification est décrite lors de phénomènes de résistance aux LMs.

Au cours de ces travaux, nous avons étudiés la régulation des systèmes de détoxification, en réponse à l'ivermectine chez l'hôte. Nous avons montré, en comparaison à une administration unique, qu'une administration répétée d'ivermectine par voie orale chez la souris est responsable de l'induction de l'expression de certains gènes transporteurs ABC et cytochromes impliqués dans son métabolisme. Ceci entraîne, à la fois, une diminution de la concentration de la molécule parentale et une augmentation de la teneur de son métabolite principal dans le plasma et l'intestin.

Ensuite, nous avons étudié l'implication des mécanismes de régulation des systèmes de détoxification, et notamment les récepteurs nucléaires, dans la tolérance à l'ivermectine chez le nématode *C.elegans*. Nous avons montré que le récepteur nucléaire nhr-a est important pour la tolérance et le développement de la résistance à l'ivermectine.

Enfin, nous avons étudié l'impact d'inhibiteurs des transporteurs ABC sur l'efficacité de l'ivermectine. Nous avons mis en évidence la capacité de certains flavonoïdes et de l'ivermectine aglycone à potentialiser l'efficacité de l'ivermectine chez le nématode.

Une exposition d'ivermectine induit la surexpression des systèmes de détoxification chez l'hôte. Ceci pourrait être la base des mécanismes moléculaires de la résistance chez le nématode. Cibler les systèmes de détoxification ou les mécanismes de résistance, par des inhibiteurs adaptés, représente une stratégie pertinente pour potentialiser l'efficacité de l'ivermectine.

MOTS-CLES : lactones macrocycliques anthelminthiques, ivermectine, transporteurs ABC d'efflux, cytochromes P450, foie, intestin, modèles murins, *Caenorhabditis elegans*, récepteurs nucléaires, flavonoïdes, ivermectine aglycone, résistance.

DISCIPLINES ADMINISTRATIVES : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Equipe Transporteurs Membranaires et Résistance

UMR1331, TOXALIM,

180, Chemin de tournefeuille - BP 93173- 31027 Toulouse Cedex 3
