

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1993

Thèse No. 333

### MODES D'ACTION DE QUELQUES ANTIHELMINTHIQUES ET DEVELOPPEMENT DES RESISTANCES PAR CERTAINS NEMATODES GASTRO-INTESTINAUX.

#### THESE

#### POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le : 20 septembre 1993

PAR

Eric MOUVEROUX

Né le 30 juin 1968 à Limoges (Haute-Vienne)

#### EXAMINATEURS DE LA THESE

M. NICOLAS Jean Albert., Professeur	- Président
M. DREYFUSS Gilles., Maître de Conférences	- Juge
M. LAMBERT Alain., Maître de Conférences	- Juge
Mme PESTRE-ALEXANDRE Madeleine., Professeur	- Juge

# UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur **RABY**
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur **GHESTEM** (1er Assesseur)  
Monsieur **DREYFUSS**, Maître de conférences (2ème Assesseur)

### PERSONNEL ENSEIGNANT :

#### **\* PROFESSEUR DES UNIVERSITES :**

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BOSGIRAUD Claudine	Microbiologie
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François-Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie
LEFORT DES YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean-Albert	Bactériologie, Virologie et Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

### SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES

#### ADMINISTRATIFS :

POMMARET Maryse

A FLO.

Monsieur le Professeur Jean Albert NICOLAS, vous avez chaleureusement accepté la présidence de ma thèse. Je tiens à vous remercier particulièrement pour l'apport de votre compétence particulière sur les résistances aux strongles gastro-intestinaux des petits ruminants, dont vous étudiez les conséquences en Limousin. L'enseignement de la microbiologie, à la faculté de pharmacie, restera marqué par la profusion de connaissances pratiques, la vivacité de votre exposé, et les anecdotes pleines d'humour dont vous émaillez vos cours. Votre présence à ce jury me touche particulièrement.

Monsieur le Maître de conférences **Gilles DREYFUSS**, il est difficile d'exprimer ce que les entretiens réguliers avec vous, m'ont apporté depuis la quatrième année de pharmacie, qui a introduit les enseignements de parasitologie. Votre intérêt pour cette science, votre constante curiosité à l'égard des étudiants, votre humour, votre savoir scientifique aboutissant toujours à une réflexion sociale ou philosophique furent pour moi le support de ce travail dont vous avez accepté d'être le directeur. Votre grande disponibilité, votre souci constant de la condition matérielle et des perspectives d'orientations futures de l'étudiant resteront pour moi un exemple. Pour tout cela et plus encore, je tiens à vous remercier sincèrement.

Madame le professeur Madeleine PESTRE-ALEXANDRE, vous avez accepté, avec beaucoup de gentillesse d'être présente à mon jury de thèse : je vous en suis reconnaissant. J'espère que vous trouverez dans ce travail un peu de l'enseignement que vous nous avez prodigué, au cours des certificats de maîtrise de parasitologie. Je vous sais gré de m'avoir initié à la parasitologie clinique par une pédagogie active. Je suis très honoré de votre présence à ce jury.

Monsieur le Maître de Conférences Alain LAMBERT, vous représentez pour moi le premier "sourire" d'une fin de matinée de février 1990, premier contact avec le laboratoire de Parasitologie comparée de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Vous et Monsieur François RENAUD, avec beaucoup de patience et de gentillesse, vous avez su m'accompagner à travers les "péripéties" que représentaient l'élaboration de ce travail et ma venue à Montpellier. Je vous suis particulièrement reconnaissant d'avoir accepté de vous déplacer pour juger ce travail sous le regard de la parasitologie fondamentale. Je tiens à vous remercier sincèrement pour votre présence dans ce jury.

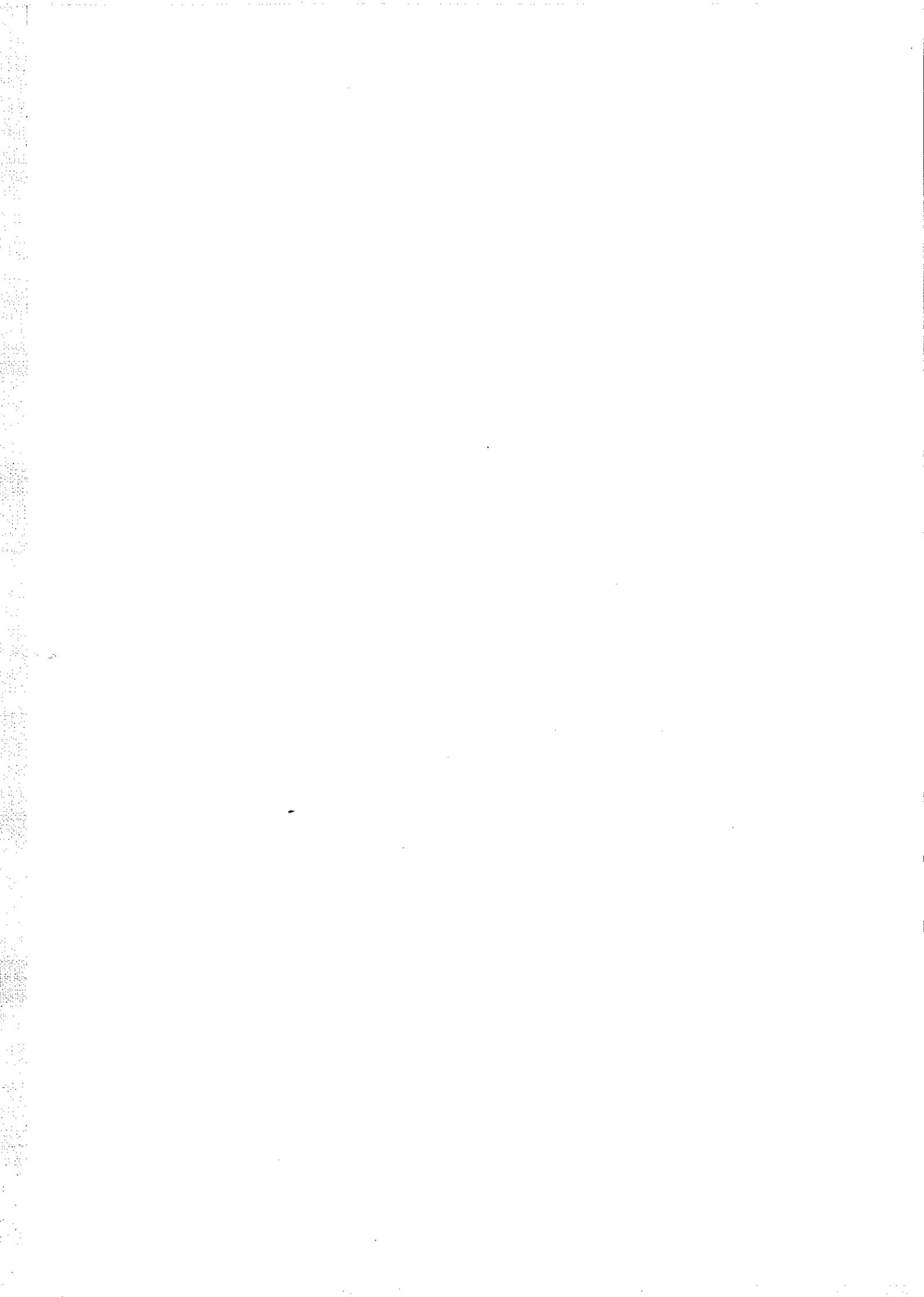
Je tiens à remercier également :

Monsieur **Philippe VIGNOLES**, pour l'aide remarquable, la disponibilité qu'il m'a prodiguées pour l'apprentissage de la rédaction et de la mise en page de ma thèse avec le logiciel WORD-PERFECT 5.1.

Madame **Geneviève DUBOST**, du Laboratoire Départemental de la Haute-Vienne pour l'impressionnante bibliographie qu'elle m'a prêtée.

Monsieur **NAJID**, "vieux complice" et qui bien que n'ayant pas participé directement à ce travail, sera toujours l'image de la connaissance, de la curiosité et du raisonnement intuitif. Tu resteras pour moi l'initiateur de mon appétit pour le monde de la recherche.

Tous mes proches, pour m'avoir supporté dans cette entreprise, parfois monacale lors de mes longs dialogues avec l'ordinateur.



# PLAN

## PLAN :

INTRODUCTION	3
CHAPITRE PREMIER : Les Nématodes gastro-intestinaux.	6
CHAPITRE DEUXIEME : Principaux antihelminthiques.	21
CHAPITRE TROISIEME : La notion de résistance.	31
CHAPITRE QUATRIEME : Méthodes de mise en évidence et d'étude de la résistance.	54
CHAPITRE CINQUIEME : Résistance et mode d'action des antihelminthiques.	74
CONCLUSION	222
BIBLIOGRAPHIE	227

## **INTRODUCTION**

Le problème de la résistance vis-à-vis d'un agent thérapeutique est maintenant généralisable à de nombreux traitements chimiothérapeutiques. La classe des antiparasitaires n'échappe pas à ce phénomène. Drudge *et al.*, en 1954, décrivent pour la première fois la résistance d'un Nématode parasite, *Trichostrongylus colubriformis*, vis-à-vis d'un anthihelminthique, la phénothiazine, chez le mouton. Depuis, et uniquement dans le monde vétérinaire, de nombreux autres cas de résistance ont été rapportés, entraînant une perte économique considérable pour les éleveurs et induisant la recherche de :

- nouvelles formes galéniques pour l'administration des composés connus
- nouvelles molécules douées de spectres élargis
- nouvelles techniques d'élevage
- nouvelles races d'élevage développant une résistance génétique aux Nématodes.

Cependant l'apparition des résistances aux anthihelminthiques n'est pas un processus anarchique. En effet son développement obéit à certaines constatations qui font l'objet de cette thèse.

Dans une première partie, nous rappellerons les principaux genres de Nématodes gastro-intestinaux développant cette résistance en insistant sur les strongles gastro-intestinaux, principaux parasites concernés par la résistance, et sur le cycle de développement de ces parasites : les différents stades de développement parasitaire ne jouant pas tous le même rôle dans l'apparition de la résistance.

Dans une deuxième partie, nous décrirons les principales familles chimiques utilisées comme anthihelminthiques, en insistant sur les traitements actifs dans les strongyloses

digestives.

Dans une troisième partie, nous nous intéresserons aux critères définissant cette résistance, ainsi qu'aux causes d'apparition de celle-ci en distinguant :

- les facteurs liés à l'antihelminthique
- les facteurs liés au parasite
- les facteurs liés au climat et à l'élevage.

Nous constaterons la difficulté d'apparition de la réversion de résistance.

Dans une quatrième partie, nous verrons les principales méthodes de détection et d'étude de cette résistance, en appréciant le mieux possible les limites de ces méthodes.

Dans une cinquième et dernière partie, nous tenterons d'appréhender le mode d'action de certains antihelminthiques, afin de se servir de ces données pour comprendre les mécanismes intimes, biochimiques, électrophysiologiques, et génétiques d'apparition des résistances. Nous insisterons sur certains modes d'action particulièrement bien décrits comme l'action sur la neurophysiologie des helminthes, le découplage de la phosphorylation oxydative, l'interférence avec le métabolisme des helminthes et enfin la perturbation de l'intégrité cellulaire. Nous corrélons ces mécanismes avec les résistances observées sur certaines familles chimiques comme, par exemple, les benzimidazoles, les tétrahydropyrimidines, les imidazothiazoles, les organophosphorés et les avermectines.

*Chapitre Premier*

**LES NEMATODES GASTRO-INTESTINAUX**

Nous allons développer dans ce chapitre les principales familles rencontrées dans la suite de cet exposé, en insistant particulièrement sur les strongles gastro-intestinaux et les cycles de développement de ces parasites.

#### 1-1 - CARACTERES BIOLOGIQUES GENERAUX :

(D'après Grassé *et al.*, 1990)

Invertébrés appartenant au sous-règne des métazoaires.

Les métazoaires sont des animaux pluricellulaires se reproduisant sexuellement par des cellules différenciées en éléments reproducteurs ou *gamètes* : *oeuf* dans le sexe femelle, *spermatozoïde* dans le sexe mâle. Au cours de la reproduction des gamètes, les cellules reproductrices subissent une réduction de moitié du nombre de leurs chromosomes passant de  $2n$  à  $n$ . La fécondation ( union d'un oeuf à un spermatozoïde) rétablit le nombre  $2n$ . Ce cycle existe chez tous les métazoaires sans exception. L'oeuf se segmentant constitue, par divisions répétées, le nouvel organisme. Dans la majorité des cas, les métazoaires sont à sexes séparés, mâle et femelle.

#### \* Métazoaires triploblastiques :

Les embryons sont alors composés de trois feuillettes : ectoderme, endoderme, mésoderme. Ils possèdent des organes spécialisés et bien définis ainsi qu'une tête (sauf chez les Echinodermes). L'embranchement des Nématelminthes appartient aux *Pseudocoelomates* (avec un coelome primitif), le différenciant des *Acoelomates* (Plathelminthes : sans coelome),

et des *Coelomates* (coelome : mésoderme s'organisant en vésicule close, présent ici au moins dans l'embryon).

\* Embranchement des Némathelminthes ou Aschelminthes :

Métazoaires à symétrie bilatérale, cylindriques ou filiformes, revêtus d'une épaisse cuticule. Le corps est non segmenté et possède une vaste cavité viscérale. Les cellules musculaires sont du type myoépithéliale. Ils ne présentent aucune cellule ciliée et les spermatozoïdes sont sans flagelle. Le développement post embryonnaire est entrecoupé de mues. Ils se composent de trois classes :

- les Gordiens
- les Acanthocéphales
- les Nématodes

\* Classe des nématodes :

Les Nématodes possèdent tous les caractères de l'Embranchement. La plupart possèdent un tube digestif ouvert. Ils mènent une vie libre ou parasite.

□□ plan d'organisation :

Les téguments comprennent une seule assise de cellules épidermiques ou *hypoderme*, dont les éléments ne sont pas toujours séparés par des membranes et forment alors un syncytium. Le tégument (cuticule) très épais, est constitué d'une substance non pas chitineuse mais composée de collagène fibreux, associé à d'autres protéines telles que la kératine.

L'hypoderme s'épaissit selon deux lignes latéro-longitudinales, dans lesquelles courent des tubes excréteurs, et deux autres lignes, l'une ventrale, l'autre dorsale, contenant les cordons nerveux. Ces saillies longitudinales délimitent quatre espaces ou *champs* dans lesquels se placent des cellules musculaires myoépithéliales : les fibres contractiles s'isolent à la périphérie d'une zone cytoplasmique étroite, au-dessus de laquelle s'étale le corps cellulaire dont les fins prolongements cytoplasmiques s'attachent aux différents viscères. Sur une coupe transversale, le nombre des cellules musculaires d'un même champ caractérise souvent le groupe systématique

Chaque canal excréteur ne serait qu'un tubule creusé à l'intérieur d'une unique cellule géante (un seul noyau par canal).

Chez les Ascarides, il existe deux paires d'énormes cellules, placées sur le trajet antérieur des tubes excréteurs (rôle peroxydasique).

La vaste cavité viscérale n'est interrompue que par les prolongements cytoplasmiques des cellules musculaires. Elle contient un plasma peuplé de cellules amiboïdes ou sanguines, ainsi que des substances toxiques et hémolytiques pour l'hôte.

Les sexes sont séparés. L'unique testicule est un cordon plein, plus ou moins pelotonné sur lui même, qui, vers son extrémité postérieure, se renfle et devient une vésicule séminale où s'accumule le sperme. Il débouche dans le rectum, formant avec l'anus une sorte de cloaque. Souvent des spicules, servant d'organes copulateurs, sortent du cloaque. Les ovaires sont eux aussi en cordons, mais au lieu de s'ouvrir vers l'arrière, ils aboutissent à un utérus dont l'orifice ou vulve est situé sur la ligne médioventrale (environ premier tiers antérieur du corps).

#### □□ Ecologie :

Les nématodes libres comptent un nombre très élevé d'espèces. 4000 ont été recensées dans les seuls sédiments marins et l'on estime qu'au moins cinq fois plus de taxons restent à découvrir. Les nématodes libres se rencontrent dans pratiquement tous les types d'environnements possibles, eaux saumâtres, eaux douces et salées (20 millions par mètre carré dans certains estuaires). Dépourvus de muscle circulaire permettant l'allogement du corps, ils se déplacent grâce aux contractions alternatives des champs musculaires ventraux et dorsaux modifiant la pression interne de la cavité viscérale turgescente. Leur tégument, parfois entièrement lisse, peut apparaître très ornementée ; elle porte les structures sensorielles : papille, soies, amphides. La morphologie de la cavité buccale, particulièrement diverse, traduit l'éventail des possibilités adaptatives et est un bon indicateur des stratégies trophiques de chaque individu : bactériophage, détritivore peu sélectif, suceur d'épistrates, herbivore ou prédateur omnivore, phytoparasites piquant et aspirant le contenu des cellules végétales grâce à leur aiguille pharygienne. A la bouche, fait suite un pharynx, un oesophage, un intestin moyen, un rectum et un anus à la partie postérieure du corps. Les espèces parasites s'attaquent aux invertébrés (surtout Arthropodes) et à toutes les classes de vertébrés, vivant soit dans les cavités (intestin, rein, coelome), soit dans les vaisseaux sanguins, soit dans les tissus. La plupart vivent en anaérobiose.

### □□ Reproduction :

La plupart des Nématodes se reproduisent par voie sexuée amphimixique ou plus rarement hermaphrodique ou parthénogénétique. La fécondation est interne ; le mâle dépose sa semence dans les voies génitales de la femelle (un cas unique de fécondation par *spermatophore* a été observé chez le nématode marin *Prorhynconema warwicki*). Certaines espèce sont vivipares, d'autres transportent leurs oeufs et embryons attachés à leur tégument. La plupart des oeufs sont pondus librement. Il existe plusieurs stades larvaires séparés par des mues.

## 1-2 - CYCLES DE DEVELOPPEMENT DE QUELQUES NEMATODES GASTRO-INTESTINAUX :

### 1-2-1 - Cycles à un seul hôte, sans stade libre :

#### 1-2-1-1 - Sans migration :

##### 1-2-1-1-1 - Super famille des *Oxyuroidea* :

Les oxyures : - Les plus grands dépassent rarement un centimètre de long. Leur corps se termine en pointe acuminée. On en connaît dans le tube digestif des arthropodes et des vertébrés. Pour *Enterobius vermicularis*, oxyure de l'homme, le mâle mesure 5 mm de long et son extrémité postérieure, tronquée est recourbée ventralement. La femelle a une longueur voisine de 1 cm, le corps est effilé à l'extrémité postérieure. Dans les deux sexes, l'extrémité antérieure porte une bouche entourée de trois lèvres rétractiles assurant une fixation solide à la muqueuse intestinale et deux crêtes longitudinales latérales permettant une identification facile.

Les oxyures adultes vivent en grand nombre dans la région iléo-caecale où ils se nourrissent de matières organiques. Après l'accouplement les mâles restent sur place tandis que les femelles sexuellement mûres se portent dans le rectum qu'elles mordillent et provoquent ainsi un prurit anal intense. Elles pondent alors sur la marge de l'anus ou se laissent entraîner par les excréments. Les oeufs se développent à une température inférieure à 30°C, condition réalisée au bord de l'anus. Les oeufs de forme ovale mesurent environ 60 µm de long et 30 µm de large. Leur coque est lisse et présente une asymétrie très

caractéristique rendant facile leur identification. Ces oeufs mûrissent et deviennent infectants dès qu'ils contiennent un embryon vermiforme (au moment de la ponte). L'homme se contamine en les ingérant. L'auto-infestation est possible. La coque de l'oeuf ramollie par le suc duodéal laisse sortir la larve qui subit ses deux premières mues dans l'intestin grêle, puis passe dans le gros intestin (en deux à quatre semaines). Elle n'effectue aucune migration.

Chez les Muridés (*Mus*, *Rattus*, *Apodemus*), les deux parasites de l'ordre des *Oxyuroidea*, les plus fréquents, sont *Aspicularis tetraptera* (*Heteroxynematidae*) et *Syphacia obvelata* (*Oxyuridae*).

Le cycle d'*Aspicularis tetraptera* débute par la migration des femelles adultes vers la partie postérieure du côlon, puis l'émission de leurs oeufs qui sont évacués dans le milieu extérieur par les fèces (pas de dépôts en région périanale comme les autres *Oxyuridae* de mammifères). Les oeufs ne deviennent infectants que 6 à 7 jours après leur émission (stade larvaire L1). L'infestation de l'hôte se fait en ingérant les oeufs embryonnés avec la nourriture souillée, par léchage, par coprophagie. Les oeufs éclosent dans l'intestin grêle de l'hôte dans les deux heures suivant l'ingestion ; une première mue (stade L2) a lieu, puis les larves migrent dans les cryptes de Lieberkühn du colon postérieur pour ne ressortir, dans la lumière intestinale, qu'au quatrième ou cinquième jour de post-infestation. Une troisième mue a alors lieu (stade L3) et le septième jour d'infestation se caractérise par une dernière migration dans la partie antérieure du côlon où elles se développent en adultes (vingtième jour pour les mâles et vingt-troisième à vingt-quatrième jour pour les femelles) (Philpot *et al.*, 1924 ; Chan *et al.*, 1955 ; Anya *et al.*, 1966 ; Behnke *et al.*, 1974 ; in Moulia, 1992).

Le cycle de *Syphacia obvelata* présente de nombreuses similitudes avec l'oxyure de l'homme. Les femelles gravides migrent du caecum vers l'anus, où elles déposent leurs oeufs embryonnés dans la région périanale. Ces oeufs semblent devenir infectants en quelques heures. La souris peut s'infecter par léchage et ingestion de nourriture souillée ; la possibilité de rétroinfestation (migration des larves écloses de la région périanale à l'anus puis le côlon) est évoquée, mais non prouvée. Les oeufs ingérés par l'hôte éclosent en deux heures et les larves migrent dans le caecum, où elles muent (deux) et deviennent adultes au bout de quatre jours. La fécondation des femelles est achevée dès le cinquième jour, avant la disparition des mâles. Elles sont gravides le neuvième jour et migrent vers l'anus dès le douzième jour post-infestation (Philpot *et al.*, 1924 ; Prince *et al.*, 1950 ; Chan *et al.*, 1952 ; in Moulia, 1992).

#### 1-2-1-1-2 - Superfamille des Trichinelloidea :

Les trichocéphales de l'homme (*Trichuris trichiura*) se caractérisent par le rétrécissement de la partie antérieure de leur corps qu'ils enfoncent obliquement dans la muqueuse du gros intestin. Ce sont des vers de couleur blanche ou rosâtre, mesurant de 30 à 50 mm pour le mâle et de 35 à 50 mm pour la femelle. La partie antérieure est effilée comme un cheveu, les deux cinquièmes postérieurs sont cinq ou six fois plus larges. Les oeufs ovalaires mesurent environ 55  $\mu\text{m}$  de long sur 20 de large et possèdent une coque épaisse interrompue à chacun des pôles qui sont obturés par un bouchon muqueux clair. Ils ne sont pas embryonnés à l'émission. L'homme s'infecte en ingérant les oeufs embryonnés [oeufs infectants en 6 à 12 mois de séjour dans le milieu extérieur (terre) pour les pays tempérés, en un mois pour les pays tropicaux]. Les larves à peine écloses pénètrent dans les villosités du caecum et y demeurent pendant 48 heures. Elles en ressortent pour achever leur développement dans la lumière intestinale (adultes en un mois). Les trichocéphales sont hématophages et peuvent causer, en cas d'infestation massive, une anémie grave, due aux toxines déversées dans l'organisme hôte.

### 1-2-1-2 - Avec migration :

#### 1-2-1-2-1 - Superfamille des *Ascaridoidea* :

Les Ascarides : ces vers de grande taille (celui du cheval dépasse parfois 30 cm) sont de longs fuseaux de teinte ivoire. Le dimorphisme sexuel est net puisque le mâle mesure de 15 à 18 cm de long pour 2 à 3 mm de diamètre, l'extrémité postérieure est enroulée en crosse vers la face ventrale et porte deux spicules courts ; on trouve aussi près de ces spicules de nombreuses papilles anales. C'est également au voisinage des spicules que s'ouvre le cloaque ventral tout à fait terminal. Dans ce cloaque se jettent l'anوس et le canal éjaculateur. La femelle est plus grande (20 à 30 cm de long pour 5 à 6 mm de diamètre) que le mâle. Son extrémité postérieure est droite et conique, elle n'a ni spicule, ni papille anale ; l'anوس est subterminal et s'ouvre directement à l'extérieur ; la vulve est située au tiers de l'animal. Leur bouche est bordée de trois lèvres charnues. Ils habitent l'intestin grêle des mammifères et chaque espèce adopte un hôte déterminé. L'homme héberge *Ascaris lumbricoides*. Ces nématodes se nourrissent du chyme intestinal. Les larves effectuent une longue migration à travers le corps de leur hôte. La femelle fécondée pond en continu des oeufs ovoïdes, entourés d'une coque très épaisse. Ils mesurent en moyenne de 60 à 70  $\mu\text{m}$  de long sur 40 à 50  $\mu\text{m}$  de large. Ils sont entourés d'une double coque brune qui leur donne un aspect mammelonné caractéristique. Dans le milieu extérieur, les oeufs achèvent leur développement et lorsque l'embryon a subi deux mues, deviennent infectants. L'homme se contamine en ingérant les oeufs arrivés à ce stade. Dans l'intestin, les larves perforent la coque de l'oeuf et traversent la paroi intestinale. Soit par la voie sanguine directe, soit en passant du péritoine au foie (séjour de trois à quatre jours) et de là dans la veine sus-hépatique puis le coeur droit, elles arrivent au poumon où elles séjournent plusieurs jours. Puis elles migrent dans les bronches et dans la trachée qu'elles remontent. Parvenues au pharynx, elles sont dégluties et ne s'arrêtent que dans l'intestin grêle où elles achèvent leur développement. La ponte des femelles commence deux mois après l'infestation. La longévité moyenne des adultes ne dépassent guère une année. Il existe d'autres espèces d'*Ascaris* : *Ascaris suum*, parasite du porc, dont la morphologie est identique au précédent, mais ne parasitant pas l'homme.

*Parascaris equorum* est un parasite du cheval.

## 1-2-2 - Cycles à un seul hôte, avec stades libres :

### 1-2-2-1 - Superfamille des Strongyloidea :

#### 1-2-2-1-1 - *Ancylostoma duodenale* et *Necator americanus* :

Ils habitent l'intestin grêle de l'homme et a une prédilection pour le duodénum. Vers cylindriques et rosés, la femelle mesure de 9 à 13 mm de long sur 0,3 à 0,6 de diamètre, avec une extrémité postérieure effilée et le mâle environ 5 à 11 mm et un peu plus grêle, avec une extrémité postérieure portant une bourse copulatrice. La taille moyenne est plus petite chez le *Necator* que chez l'*Ankylostome* et chez ce dernier la flexure cervicale est plus douce. La région antérieure est différenciée en une capsule buccale, rigide avec des crochets et des plaques tranchantes permettant de différencier les espèces. La bouche s'ouvre au fond d'une capsule buccale armée de deux paires de crochets et de lames coupantes. Le ver se fixe à l'intestin et en broute la muqueuse, provoquant de petites hémorragies persistantes, car la sécrétion des glandes céphaliques a des vertus anticoagulantes. La ponte est continue et innombrable. L'oeuf n'évolue qu'en dehors de l'hôte ; il lui faut de l'oxygène et une température inférieure à 37°C, mais supérieure à 14°C ; il exige aussi un degré hygrométrique élevé, toutes conditions réalisées dans la terre mouillée des régions tropicales ou dans les galeries de mines et les briqueteries des régions tempérées. Les oeufs sont ovoïdes, ont une coque lisse, mince et transparente, et mesurent en moyenne de 60 à 70  $\mu\text{m}$  sur 35 à 40  $\mu\text{m}$ . A l'émission, l'oeuf n'est pas embryonné mais contient une cellule ovalaire dont le cytoplasme est déjà segmenté en 4 à 8 cellules (blastomères) n'emplissant pas la totalité de la coque de l'oeuf. De l'oeuf sort un vermicule ou larve de premier stade en 24 à 48 heures (larve rhabditoïde libre : oesophage musculéux avec bulbe oesophagien et appareil valvulaire donc à double renflement) de 250 à 300  $\mu\text{m}$  de long qui augmente de taille en s'alimentant et s'imbibant d'eau pour muer en larve strongyloïde ou strongyloforme (oesophage simple non renflé) du deuxième stade, de 500 à 700  $\mu\text{m}$ , au troisième jour. Au cinquième jour, cette larve subit une nouvelle mue pour former la larve strongyloïde enkystée ou filariforme qui reste dans sa mue, ne se nourrit plus et peut résister plusieurs mois dans le sol. A ce stade, la larve peut infecter l'homme. Si elle arrive au contact de la peau, elle pénètre aussitôt activement dans les tissus (pieds nus, muqueuse buccale...). Le torrent

circulatoire l'emportant, elle ne s'arrêtera que dans les poumons, après un passage par le courant de retour et le coeur droit. Après une mue et le passage de la paroi des alvéoles, elle passe dans les bronches, remonte la trachée comme le font les larves d'Ascarides et se laisse tomber dans l'oesophage, terminant sa croissance dans l'intestin grêle. Deux mues ont lieu dans le duodénum. Il faut environ de 4 à 6 semaines entre la pénétration cutanée et la ponte des femelles gravides, la longévité des adultes est de quatre à cinq ans pour *A. duodenale* et d'une dizaine d'années pour *N. americanus*. La contamination par voie buccale est possible, mais la larve n'en effectue pas moins son voyage et passe obligatoirement par les poumons.

1-2-2-1-2 - Les strongles gastro-intestinaux (décrits ici chez les ruminants ovins et bovins : (Tableau No. 1)

Les strongles, *sensu lato*, sont des nématodes de l'ordre des *Strongylida*, du sous-ordre des *Trichostrongyloidea*, de la famille des *Trichostrongylidae*. On y associe le plus souvent les vers du sous ordre des *Strongyloidea*, de la famille des *Strongylidae* ou des *Ancylostomatidae*, et respectivement de la sous famille des *Oesophagostominae* ou des *Bunostominae*. Ces "strongles" sont des vers ronds, de petite taille, généralement inférieure à 3 cm. Les mâles sont caractérisés par des bourses copulatrices et de deux spicules. Les genres *Bunostomum* et *Oesophagostomum* sont dépourvus de capsule buccale. Ces vers ont un aspect général de petits vers fins, peu visibles. Les femelles sont ovipares et pondent des oeufs qui ont tous la même organisation. Ils sont limités par une coque mince, lisse, ellipsoïde. Ils renferment une morula qui n'occupe pas la totalité de l'oeuf. Leur taille reste constante de 90-70 x 55-40  $\mu\text{m}$ . La diagnose de genre nécessite toujours un recours à la coproculture ( l'identification se faisant alors sur les larves de stade 3 ou infestantes). Mais il existe quelques exceptions : les oeufs des genres *Nematodirus* et *Marshallagia* sont de grande taille (150-200 x 80-90  $\mu\text{m}$ ). Les oeufs de *Nematodirus* renferment une morula contenant de gros blastomères peu nombreux et ont des extrémités relativement pointues. Les oeufs de *Marshallagia* renferment une morula avec de petits et nombreux blastomères. Les oeufs du genre *Bunostomum* ont une taille moyenne, mais contiennent au moment de la ponte un petit nombre de blastomères (4 à 8).

**Tableau No. 1 - Les strongles gastro-intestinaux des Bovins et petits ruminants (Liste non-exhaustive)**

Localisation	Genres et espèces	Espèces animales	Morphologie	Nutrition
Caillette	<i>Haemonchus contortus</i> <i>H. placei</i>	PR B	Vers "rouges" ou vers "mirillons" de grande taille : 15 à 35 mm de Lo. / 400 à 600 µ de D., visibles à l'oeil nu.	Hématophage au stade adulte et au stade larvaire.
	<i>Trichostrongylus axei</i>	B,PR	Très fin, 3 à 8 mm de Lo. / 60 à 90µ de D.	Hématophage
	<i>Ostertagia ostertagi</i> <i>O. circumcincta</i> <i>O. trifurcata</i> <i>O. pinnata</i>	B,PR PR PR PR	"Vers bruns" de l'estomac, de grande taille : 6 à 12 mm de Lo. / 80 à 160µ de D.	Hématophage au stade adulte
intestin grêle	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	B,PR	Très fin, 4 à 7 mm de Lo. / 70 à 90µ de D.	Chymivores
	<i>Cooperia caueci</i> <i>C. oncophora</i> <i>C. pectinata</i>	B,PR B,PR B	Blanchâtres, de 6 à 10 mm de Lo. / 80 à 120µ de D.	Chymivores
	<i>Nematodirus filicollis</i> <i>N. helveticus</i> <i>N. battus</i> <i>N. spathiger</i>	B,PR B,PR B,PR PR	Blanchâtres, de 10 à 30 mm de Lo. / 150 à 300µ de D.	Chymivores
	<i>Bunostomum phlebotomum</i> <i>B. trigonocephalum</i>	B PR	Grisâtres, de 12 à 25 mm de Lo. / 300 à 500µ de D.	Hématophages
	<i>Strongylodes papillosus</i>	B,PR	Très fin de 3 à 5 mm de Lo. / 50 à 60µ de D.	Histiophages
Gros intestin	<i>Oesophagostomum radianum</i> <i>Oesophagostomum venulosum</i>	B,PR B,PR	Blancs, de 12 à 25 mm de Lo. / 300 à 400µ de D.	Chymivores
	<i>Chaberita ovina</i>	PR	De 15 à 20 mm de Lo. / 400 à 500µ de D. Parfois rougeâtres	Hématophage au stade larvaire, histiophage au stade adulte

Lo. = Longueur ; D. = Diamètre ; B = Bovins ; PR = petits ruminants

Les oeufs sont émis dans le milieu extérieur avec les matières fécales. Ils évoluent en larves lorsque les conditions climatiques le permettent. On distingue classiquement six stades de développement (quatre stades larvaires ( $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$ ,  $L_4$ ), un stade préimaginal (stade 5), un stade imaginal ou adulte.  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  sont des stades libres, la larve de troisième âge représente le stade infectant. Le développement jusqu'au stade infectant, dans le milieu extérieur, est de durée variable : de 8-10 jours à plusieurs semaines. Le développement est plus long pour les espèces du genre *Nematodirus* : au moins trois semaines. Les larves 1 sont de type rhabditoïde, mesurent environ 300  $\mu\text{m}$  de long et contiennent de nombreuses granulations de réserves. Les larves 2 sont également rhabditoïdes et mesurent 500  $\mu\text{m}$  de long. Les larves 1 et 2 se nourrissent de bactéries et de champignons. Les larves de troisième âge sont de type strongyloïde (perte de l'appareil valvulaire, oesophage musculé simple) et mesurent 900 à 1000  $\mu\text{m}$  de long. Elles sont engainées dans l'exuvie de la larve 2.

Les stades parasites des strongles digestifs sont des parasites de l'abomasum ou de l'intestin grêle (sauf *Oesophagostomum*). Les genre *Haemonchus*, *Teladorsagia* et l'espèce *Trichostrongylus axei* sont des parasites de la caillette (abomasum). Tous les autres genres sont parasites de l'intestin grêle. Les adultes se nourrissent en général du chyme intestinal et des exsudats inflammatoires qu'ils provoquent, d'autres sont hématophages tels : *Haemonchus*, *Bunostomum*, *Teladorsagia* (à degré moindre). Les stades parasitaires  $L_4$ , stade 5, et adultes sont situés dans la même portion du tractus digestif mais s'enfoncent en profondeur dans la muqueuse ou restent en superficie selon leur stade et leur genre.

Les stades libres vivent localisés sur le sol ou la base des végétaux. Les larves infectantes ( $L_3$ ) sont sensibles à la dessiccation et à la lumière (phototropisme négatif). Elles n'envahissent les végétaux qu'aux heures fraîches de la journée : matinée et soirée, et restent sur le sol aux heures chaudes. Les ovins broutant l'herbe à la base, sont plus disposés à s'infecter de  $L_3$  que les bovins.

Le cycle évolutif est monoxène (un seul hôte parasité lors du déroulement complet du cycle) et l'on distingue le développement endogène (chez l'animal) du développement exogène (dans le milieu extérieur).

\* Développement endogène :

Les larves infectantes sont en général ingérées (excepté le genre *Bunostomum* pour lequel les  $L_3$  pénètrent par voie percutanée). Ces larves atteignent leur localisation élective

et perdent alors leur gaine puis muent en L<sub>4</sub> puis stade 5 pour donner des adultes. Les L<sub>4</sub> occupent le plus souvent les cryptes de la muqueuse digestive. La période prépatente s'étale sur trois semaines pour les *Trichostrongylidae* et sur un mois et demi pour les *Strongylidae* (au terme de cette période la coproscopie devient positive). Un phénomène particulier caractérise ces espèces : l'hypobiose. En effet, les larves ont la possibilité d'arrêter leur développement au stade 4. Cette hypobiose semble avoir deux origines superposables :

- facteurs immunitaires - la réponse immunitaire de l'hôte provoque une réaction d'enkystement du parasite dans un granulôme qui l'empêcherait de poursuivre son développement, sans pour autant le tuer.

- facteurs physiologiques - les larves de troisième âge subissant l'action des premiers froids en automne vont se mettre en "diapause" larvaire. Le système immunitaire de l'hôte n'est ici pas à l'origine de cet arrêt de développement.

La sortie de l'hypobiose se fera, soit à la sortie de l'hiver, aux environs du mois de mars, soit lors de déficit immunitaire lors de la parturition, de la lactation, de maladies intercurrentes...

#### \* Développement exogène :

Ce type de développement est fonction des conditions climatiques. Le développement larvaire nécessite de l'aération, de l'humidité et des températures optimales. L'optimum thermique se situe entre 20 et 23°C, mais certaines espèces thermophiles comme *Haemonchus contortus* préfèrent des températures de 27-28°C. Le degré hygrométrique nécessaire est directement corrélé à la température. *Haemonchus contortus* est l'espèce prédominante sous les climats tropicaux. D'autres espèces semblent adaptées aux climats tempérés frais : *Teladorsagia sp.* et *Nematodirus sp.*. Le développement des stades libres est une phase critique où la mortalité peut atteindre 99%. Les prairies sont contaminées progressivement au début du printemps, puis on observe une progression rapide du nombre de L<sub>3</sub> qui atteignent un pic à la fin du printemps-début de l'été (juin, juillet). Les L<sub>3</sub> sont détruites par la sécheresse et les oeufs n'évoluent pas (la courbe s'infléchit en été). Un second pic apparaît en automne (septembre-octobre).

Les larves infectantes présentes sur les pâturages au printemps ont plusieurs origines possibles :

- présence de larves transhivernantes, appartenant au genre *Teladorsagia* et

*Nematodirus*. Les larves de *Teladorsagia* survivent enfouies dans les couches superficielles du sol pendant un à deux ans. Leur réapparition en surface s'effectue par le piétinement des prairies par les animaux, par le ruissellement, par l'activité des Annélides oligochètes ("vers de terre": *Lumbricus terrestris*). Le développement larvaire du genre *Nematodirus* se déroulant dans l'oeuf, la coque lipoprotéique de ces derniers permet alors la survie de L<sub>3</sub> plusieurs années sur les prairies (problème posé par ce type d'oeufs pour la réalisation des essais *in vitro*).

- les larves peuvent provenir des oeufs émis avec les matières fécales des premiers ruminants mis sur les pâturages. Ces oeufs sont pondus par des Nématodes femelles ayant passé l'hiver dans le tractus digestif des ruminants (longévité de 5 à 8 mois), ou par des femelles se développant après la levée de l'hypobiose.

Les caractéristiques physiopathologiques découlent de mécanismes d'irritation, de spoliation, de toxicité et d'antigénicité des strongles. Les animaux réceptifs et sensibles sont les jeunes ruminants. Les adultes s'immunisent progressivement, mais restent néanmoins réceptifs, hébergeant des strongles plus petits, moins pathogènes, moins prolifiques. Ce type d'immunité est qualifiée d'immunité de coinfestation, elle n'est pas durable et nécessite un entretien par des infestations successives. Une immunité vraie, stérilisante, est par contre décrite pour l'haemonchose à *Haemonchus contortus*. Les animaux adultes représentent alors une source parasitaire pour les jeunes ruminants. Les symptômes observés se classent en un syndrome anémique (haemonchose), et un syndrome gastro-entéritique.

#### 1-2-2-2 - Superfamille des Rhabditoidea :

*Strongyloides stercoralis* est responsable de l'anguillulose ou strongyloïdose. *S. stercoralis* existe sous la forme d'adulte parasite dont on connaît seulement la femelle dite pathénogénétique. Il est aussi décrit des formes adultes libres mâles et femelles appelés formes stercorales et des larves.

La femelle parthénogénétique mesure 2,5mm de long. La femelle stercorale libre possède un oesophage rhabditoïde et mesure 1mm de long. Le mâle libre est plus petit (0,7mm de long). Les larves rhabditoïdes mesurent de 250 à 300  $\mu\text{m}$  et se trouvent dans les selles, les larves strongyloïdes ou larves filariformes sont les larves infectantes et mesurent 600 à 700  $\mu\text{m}$  sur un diamètre de 12  $\mu\text{m}$ .

*S. stercoralis* parasite uniquement l'homme et présente deux modes de multiplication expliquant la persistance de la parasitose. Une multiplication sexuée sur le sol et une reproduction parthénogénétique chez l'homme.

1-2-2-2-1 - Cycle indirect avec passage dans le milieu extérieur :

\* Cycle endogène (chez l'homme) :

La larve strongyloïde infectante pénètre à travers la peau (en 3 à 5 mn, donnant des signes cutanés, *larva currens*) puis, gagne le poumon (entre le sixième et le neuvième jour, en engendrant des signes pulmonaires : toux, asthme et syndrome de Löffler) par le système lymphatique et la circulation générale. Elle remonte les voies aériennes pour être déglutie et se transformer en femelle parthénogénétique adulte dans l'intestin grêle (vers le dix-septième jour) où elle s'enfonce dans la muqueuse (signes intestinaux : douleurs abdominales, diarrhées) pour pondre ses oeufs. Ces derniers éclosent sur place pour donner des larves rhabditoïdes qui vont gagner la lumière intestinale et être évacuées par les selles (vers le vingt-septième jour).

\* Cycle exogène (sur le sol) :

Les larves rhabditoïdes vont se transformer en adultes libres stercoraux mâles et femelles qui s'accouplent pour donner des oeufs puis des larves rhabditoïdes. Les conditions de développement dépendent de la nature du sol, de l'humidité, de la température supérieure à 20°C pour faciliter ce cycle stercoral. Cette larve rhabditoïde va se transformer en larve strongyloïde infectante en 3 à 5 jours. La durée de vie de la larve strongyloïde ne dépasse pas 18 jours pendant lesquels elle ne s'alimente pas. Cette transformation se produit soit directement, soit après un stade d'adultes sexués.

1-2-2-2-2 - Cycle direct endogène :

La particularité biologique propre à l'anguillule réside dans le développement d'un cycle interne par transformation directe des larves rhabditoïdes en larves strongyloïdes infectantes sans passage dans le milieu extérieur. Ce cycle se déroule dans le tube digestif ou au niveau de la marge de l'anus. Ce cycle interne explique la tenacité et la durée (30 ans et plus) de cette parasitose ainsi que les formes malignes de la maladie (surtout sous corticothérapie : anguillulose maligne aiguë de type septicémique et disséminé).

*Chapitre Deuxième*  
**PRINCIPAUX ANTIHELMINTIQUES**

Cette classification chimique est inspirée des articles de Campbell, en 1989, 1990, ainsi que des travaux de Maugein, en 1982, de Beugnet, en 1991 et du Vidal, 1993. Nous verrons successivement les dérivés d'origine naturelle où l'ivermectine apparaît comme la dernière famille d'antihelminthiques mise sur le marché, puis les dérivés de synthèse où les benzimidazoles occupent la principale place de par leur large spectre et leur importante utilisation mondiale. Enfin nous détaillerons plus particulièrement les principaux médicaments utilisés contre les strongyloses gastro-intestinales des ruminants, composés les plus sensibles au développement de la résistance.

## **2- LES COMPOSES ACTIFS CONTRE LES HELMINTHES (Liste non exhaustive) :**

Abréviations utilisées : TH(s) = Thérapeutique(s) humaine(s) ; TV(s) = Thérapeutique(s) vétérinaire(s) ; RM = retiré du marché.

### **2-1 - DERIVES NATURELS :**

#### **2-1-1 - Les alcaloïdes de l'ipéca :**

L'émétine est utilisée depuis longtemps dans le traitement des amibiases, mais elle possède une activité fasciolicide ; la déhydroémétine (Déhydroémétine Roche® (TH)) semble moins toxique, et est utilisée dans le traitement des amibiases tissulaires, des distomatoses hépatobiliaires, des bilharzioses à *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma mansoni*.

### 2-1-2 - Les dérivés du phloroglucinol :

Ils sont extraits de la fougère mâle (*Dryopteris filix-mas* L.) et sont représentés par l'oléorésine d'aspidium, l'aspidine (Polystichin<sup>®</sup> (TV)) et la désapidine.

### 2-1-3 - Les avermectines :

Elles sont isolées à partir de la fermentation de l'actinomycète *Streptomyces avermitilis*.

- l'abamectine ou l'ivermectine B<sub>1</sub> (Avamec<sup>®</sup> (TV))
- L'ivermectine ou 22,23 dihydroivermectine B<sub>1</sub> (Mectizan<sup>®</sup> (TH)) pour le traitement de l'onchocercose à *Onchocerca volvulus* et (Ivomec<sup>®</sup>, Oramec<sup>®</sup>, Eqvalan<sup>®</sup>, Cardomec<sup>®</sup>, Heartgard 30<sup>®</sup>, Zimectérin<sup>®</sup> (TVs)).

## 2-2 - LES DERIVES DE SYNTHESE :

### 2-2-1 - Les dérivés de l'antimoine :

Ils sont utilisés depuis plus de soixante ans, peu efficaces et très toxiques.

- antimonio tartrate de potassium (Eméto-Na<sup>®</sup>, Stibunal<sup>®</sup> (TVs))
- antimonio tartrate de sodium
- antimonio gluconate de sodium
- anthiolimine ou anthiomaline
- stibocaptate (Astiban<sup>®</sup> (TV))
- stibophen (Fuadin<sup>®</sup>, Fantorin<sup>®</sup> (TVs))

### 2-2-2 - Les dérivés arsénicaux :

La difétarsone (Bémarsal<sup>®</sup> (RM)), est un amoebicide mais possède une activité contre les trichocéphalose à *T. trichiura* et les oxyuroses rebelles aux autres thérapeutiques. On peut noter également l'activité du mélarsen (Trimélarsan<sup>®</sup> (TV) ) contre les filarioses, la dracunculose et l'onchocercose.

### 2-2-3 - Les composés hétérocycliques :

- La phénothiazine (Antiverm<sup>®</sup>, Vermitin<sup>®</sup> (TVs))

#### 2-2-4 - La pipérazine et ses dérivés :

De la famille des diéthylène diamines, elle a été commercialisée sous de nombreuses formes (citrate, phosphate, adipate, tartrate). Elle est active contre les parasitoses de l'intestin grêle et du gros intestin comme l'oxyurose et l'ascaridiose. En thérapeutique humaine, elle est connue sous le nom d'Antelmina<sup>®</sup> (TH) (hydrate) ou de Nématorazine<sup>®</sup> (TH) (sébacate) et en vétérinaire (Adiprazine<sup>®</sup>, Antépar<sup>®</sup>, Anthelmin<sup>®</sup> (TVs)). On utilise aussi la trichlofénol pipérazine et la diéthyl carbamazine [Banocide<sup>®</sup> (TV), Notezine<sup>®</sup> (TH) (citrate)].

#### 2-2-5 - Les dérivés chlorés :

- Le tétrachlorure de carbone
- L'hexachloroéthane
- L'hexachloroparaxylol

Ils sont tous retirés du marché de par leur grande toxicité.

- Le tétrachloroéthylène (Didakene<sup>®</sup> (TV), Ankilostin<sup>®</sup> (TV), Perclène<sup>®</sup> (TV), Tetracap<sup>®</sup> (TV), Tetropil<sup>®</sup> (TV))
- Le dichlorophène

#### 2-2-6 - Les organophosphorés :

Leur toxicité est connue (neurotoxicité), ils sont de moins en moins utilisés

- Dichlorvos (Vapona<sup>®</sup>, Nerkol<sup>®</sup>, Task<sup>®</sup>, Tenac<sup>®</sup>)
- Trichlorvos
- Métrifonate (Bilarcil<sup>®</sup>)

#### 2-2-7 - Les ammoniums quaternaires :

- Le béphénium dans les ankylostomoses (efficacité supérieure sur *A. duodenale* que sur *N. americanus*) et les ascaridioses [Alcopar<sup>®</sup> (TH) (embonate) ; Naphtamon<sup>®</sup>, Lecibis<sup>®</sup> (TVs)].

- Le diphézyll

#### 2-2-8 - Les dérivés de la pyridine :

- La méthyridine
- Le stylbarzium (RM)

#### 2-2-9 - Les tétrahydro-pyrimidines :

- Le pyrantel [Combantrin<sup>®</sup> (TH) (pamoate), Helmintox<sup>®</sup> (TH) (pamoate)] actif sur *E. vermicularis*, *A. lumbricoides*, *A. duodenale* et *N. americanus*, utilisé aussi sous forme de tartrate (Exhelm<sup>®</sup> (TV)).

- le morantel ou méthyl pyrantel (Suiminth<sup>®</sup>, Paratec<sup>®</sup> (TVs))

#### 2-2-10 - Les dérivés diphényls et diphényls substitués :

- Le niclofolan (Distolon<sup>®</sup>, Bilévon<sup>®</sup> (TVs))

- le bromfénofos (Acedist<sup>®</sup> (TV))

- le bithionol appartenant au diphénylsulfures (Actamer<sup>®</sup>, Bitin<sup>®</sup>, Aténian<sup>®</sup> (TVs))

Ces dérivés sont surtout actifs contre les Trématodes.

- L'hexachlorophène

#### 2-2-11 - Les benzanilides ou salicylanilides :

Ils sont essentiellement fasciolicides, mais certains sont actifs contre les cestodes.

- Le cloxanide (Syd-230<sup>®</sup> (TV), Trémérad<sup>®</sup> (TV))

- L'oxycloxanide (Zanil<sup>®</sup> (TV))

- Le rafoxanide (Flukanide<sup>®</sup>, MK 990<sup>®</sup>, Ranide<sup>®</sup> (TVs))

- Le niclosamide (Trédémine<sup>®</sup> (TH), Mansonil<sup>®</sup>, Aténase<sup>®</sup>, Fénasal<sup>®</sup>, Yoméstan<sup>®</sup>, Téniasol<sup>®</sup> (TVs)), taenicide actif sur le *Taenia saginata*, sur le *Taenia solium*, sur le bothriocéphale *Diphyllobothrium latum*, et *Vampirolepis (ex Hymenolepis) nana*.

- Le résorantel (Téréno<sup>®</sup> (TV), Hoe 296 V<sup>®</sup> (TV), Résorcylam<sup>®</sup> (TV), Résorcantel<sup>®</sup> (TV))

- Le closantel (Flukiver<sup>®</sup>, Séponver<sup>®</sup>)

#### 2-2-12 - Les cyanines :

- Le pamoate ou embonate de pyrvinium [Povanyl<sup>®</sup>, (embonate) (TH)], actif dans les oxyuroses, et [Pamovin<sup>®</sup>, Néo-oxypaat<sup>®</sup>, Alnoxin<sup>®</sup> (Pamoate) (TVs)].

#### 2-2-13 - Les dérivés de l'acridine :

- La quinacrine (Acridine<sup>®</sup>, Erion<sup>®</sup> (TVs))

- L'acranil

2-2-14 - Les thioxanthonnes :

- Le lucanthone (Miracil D<sup>®</sup>, Tixantone<sup>®</sup> (TVs))
- L'hycanthone (Etrénol<sup>®</sup> (TV))

2-2-15 - Les dérivés de l'imidazole et imidazothiazoles :

- Le métronidazole de la famille des nitro-5 imidazolés (Flagyl<sup>®</sup> (TH)), il est surtout utilisé contre les germes anaérobies et en parasitologie contre les Protozoaires *Trichomonas vaginalis*, *Giardia intestinalis* et *Entamoeba histolytica*.

- Le tétramisole (Uniscaril<sup>®</sup>, Anthelvet<sup>®</sup>, Appercol<sup>®</sup>, Brot<sup>®</sup>, Vermipan 3%<sup>®</sup>, Thelmazole 3%<sup>®</sup>, Polystrongle inj.<sup>®</sup>, Imena<sup>®</sup> (+oxyclozanide), Douvimisole<sup>®</sup> (+ Bithionol) (TVs))

- Le lévamisole [Solaskyl<sup>®</sup> (Chlorhydrate) (TH)] contre les ascaridioses et les ankylostomoses et (Némicide<sup>®</sup>, Nilvermel<sup>®</sup>, Némisol L15 inj.<sup>®</sup>, Pagliderm<sup>®</sup>, Paglisol<sup>®</sup>, Niratil<sup>®</sup>, Chromintic diffuseur<sup>®</sup>, Lévoripercol<sup>®</sup>, Anthelsol<sup>®</sup>, Thelmazole<sup>®</sup> Douvanthelm<sup>®</sup> (+bithionol), Nilzan NF<sup>®</sup> (+bithionol) (TVs)).

2-2-16 - Les benzimidazoles :

2-2-16-1 - Les thiazolyl benzimidazoles :

- Le thiabendazole (Thibenzole<sup>®</sup>, Equizole TBZ<sup>®</sup>, Equivet-Tz<sup>®</sup>, Némapan<sup>®</sup> (TVs))

2-2-16-2 - Les carbamates de thiazolyl benzimidazoles :

- Le cambendazole (Bovicam<sup>®</sup>, Camvet<sup>®</sup> (TVs))

2-2-16-3 - Les méthyl carbamates de benzimidazoles :

- Le carbendazim

- Le parbendazole (Helmatac<sup>®</sup>, Wormgard<sup>®</sup> (TVs))

- L'oxibendazole (Anthecide EQ<sup>®</sup>, Equitac<sup>®</sup>, Equipar<sup>®</sup>, Versine<sup>®</sup>, Niclozole<sup>®</sup> (TVs))

- L'albendazole (Valbazen<sup>®</sup>, Proftril diffuseur<sup>®</sup> (TVs)). Le Zentel<sup>®</sup> (TV et TH) est actif sur l'homme contre la plupart des parasitoses intestinales à un ou plusieurs parasites

du type, pour les Nématodes, de l'oxyurose à *E. vermicularis*, de l'ascaridiose à *A. lumbricoides*, de l'ankylostomose à *A. duodenale* et *N. americanus*, de la trichocéphalose à *T. trichiura*, de l'anguillulose à *S. stercoralis*, et pour les cestodes, des taeniasis à *T. saginata* et *T. solium*.

- Le ricobendazole (Bental<sup>®</sup>, Rycoben<sup>®</sup> (TVs))
- Le ciclobendazole
- Le mébendazole (Vermox<sup>®</sup>, Telmin<sup>®</sup>, Telmintic<sup>®</sup>, Supaverm<sup>®</sup>, Telmin B<sup>®</sup>, Multispec Bolus<sup>®</sup>, Mébenvet<sup>®</sup> (TVs))
- Le nocodazole, médicament antitumoral
- Le flubendazole (Flubenol<sup>®</sup>, Flumoxal<sup>®</sup>, Flutelmium<sup>®</sup>, Biovermin<sup>®</sup> (TVs)), et Fluvermal<sup>®</sup> (TH), ce dernier étant utilisé dans les oxyuroses, les ascaridioses, les trichocéphaloses, les ankylostomoses.
- Le fenbendazole (Panacur<sup>®</sup>, Safe-guard<sup>®</sup>, Axilur<sup>®</sup> (TVs))
- L'oxfendazole (Synanthic<sup>®</sup>, Benzelmin<sup>®</sup>, Systemex<sup>®</sup>, Autoworm<sup>®</sup> (TVs))
- Le luxabendazole
- Le triclabendazole (Fasinex<sup>®</sup> (TV))

#### 2-2-16-4 - Les prodrogues :

- Le bénomyl
- Le fébantel (Famille des guanidines) ; (Rintal<sup>®</sup>, Vercom<sup>®</sup>, Combotel<sup>®</sup> (TVs))
- Le thiophanate (Famille des thio-allophanates) ; (Strongynate<sup>®</sup> (TV))
- Le nétobimin (Famille des nitrophényl-guanidines) ; (Hapadex<sup>®</sup>, Hapasil<sup>®</sup>, (TVs))

#### 2-2-17 - Dérivés divers :

- Le bitoscanate
- La suramine (Moranyl<sup>®</sup>)
- L'arécoline (bromhydrate)
- La paromomycine, antibiotique de la famille des aminosides active dans les amibiases et les giardioses (Humagel<sup>®</sup> (TH)).
- Le niridazole (Ambilhar<sup>®</sup> (TV)), utilisé dans le traitement de *S. mansoni* et *S. haematobium*.
- L'oxamniquine dérivé de la tétrahydroquinoline (Vansil<sup>®</sup> (TH)), utilisé dans le traitement des bilharzioses à *S. mansoni*.
- Le praziquantel (Biltricide<sup>®</sup> (TH)) dérivé des pyrazino-isoquinolines dans le traitement des bilharzioses à *S. haematobium*, à *S. intercalatum*, à *S. japonicum*, à *S. mansoni*, ainsi que dans le traitement des distomatoses hépatiques à *Clonorchis sinensis* et *Opisthorchis viverrini* et pulmonaires à *Paragonimus westermani* (Droncit<sup>®</sup>, Embay 8440<sup>®</sup> (TV)).
- L'oltipraz
- Le nitroxynil de la famille des benzonitriles (Dovénix<sup>®</sup> (TV)).
- L'hétolin, dérivé benzénique.
- La diamphénétine (Coriban<sup>®</sup>)

### **2-3 - LES PRINCIPAUX MEDICAMENTS ACTIFS CONTRE LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX DES RUMINANTS : (Tableau No. 2)**

Ce tableau montre l'abondance des spécialités à usage vétérinaire dans le traitement des strongyloses des ruminants, parasites donnant lieu à un fort développement de résistances. Il faut remarquer la multiplication des spécialités concernant les benzimidazoles, et les imidazothiazoles. En effet, l'apparition précoce de résistances à ces produits a entraîné une grande variété dans les modes d'administration et les formes galéniques de ces composés. Par contre, la récente introduction de l'ivermectine, impliquant néanmoins l'apparition de résistances, explique la commercialisation d'une seule spécialité l'Ivomec®.

**Tableau No. 2 - Principaux médicaments actifs dans le traitement des strongyloses gastro-intestinales des bovins et petits ruminants.**

Famille	Principes actifs	Noms commerciaux	Mode d'administration	Délais d'attente (en jours)	
				LAIT	VIANDE
Thiazolyl-benzimidazoles	Thiabendazole B.O.C.	Thibenzole® Némopan®	Buvable Buvable	6	5
Carbamates de benzimidazoles	Métabendazole O.C.	Multispec®	Buvable	4	14
	Oxibendazole B.O.C	Loditac Benzoverm®	Buvable? Buvable?	3	14
	Fenbendazole B.O.C.E.	Panacur®	Buvable et aliments	3	14
	Oxfendazole B.O.	Synanthic®	Buvable	0	14
	Albendazole B.O.	Valbazen® Proftril®	Buvable et aliments Diffuseur	I.L.	10
Prodrogues de benzimidazoles	Febantel B.O.C.	Rintal®	Buvable et aliments	0	10
	Thiophanate B.O.C	Strongynat®	Buvable	6	5
	Nétomibin (tartrate) B.O.C	Hapadex®	Buvable et injectable	I.L.	10
Tétrahydropyrimidines	Pyrantel B.O.C.P.	Exhelm®	Buvable	0	14
	Morantel (tartrate)	Paratec®	Diffuseur	-	-
Imidazothiazoles	Lévarnisole B.O.C.P.	Anthelcol® Thelmazole® Pagüisol® Némisol L15® Ripercol® Pagliderm® Nirati® Chromintic®	Buvable Buvable buvable Injectable Injectable Transcutané Transcutané Diffuseur	2	3
	Tétramisole	Vermipan 3%® Thelmazole 3%® Polystrongle®	Buvable Buvable Injectable		
Salicylanilides	Closantel	Flukiver® Séponver®	Injectable Buvable		
Avermectine	Ivermectine B.O.C.	Ivomec®	Injectable et buvable	I.L.	
Associations	Tétramisole + Bithionol sulfoxyde	Douvimisole®	Buvable		
	Tétramisole + Oxyclozanide	Iména®	Buvable		
	Lévarnisole + Bithionol sulfoxyde	Douvanthelm® Nilzan®	Buvable		
	Thiabendazole + Rafoxanide	Ranizole®	Buvable		

B = Bovins ; O = Ovins ; C = Caprins ; P = Porcins ; E = Equins ; S.G.I. = actifs sur strongles gastro-intestinaux ; I.L. = interdit en lactation.

*Chapitre troisième*  
**LA NOTION DE RESISTANCE**

Dans ce chapitre nous nous attarderons sur les définitions des différentes résistances de la pseudorésistance et de la réversion de résistance. Nous insisterons sur les caractéristiques de cette résistance, liées à l'antihelminthique, au parasite, ainsi qu'au climat et à la technique d'élevage.

### 3-1 - DEFINITION DE LA NOTION DE RESISTANCE AUX ANTIHELMINTHIQUES:

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé toute résistance d'un organisme vis à vis d'un toxique se définit par :

**"Le développement de la capacité d'individus d'une souche à tolérer des doses de toxiques qui seraient létales pour la majorité des individus d'une population normale de la même espèce."**

Cette notion est maintenant précisée par le calcul d'un facteur de résistance correspondant au rapport de la dose létale 50% (DL<sub>50</sub>) de la souche supposée résistante sur la dose létale 50% d'une souche sensible de la même espèce. Si ce facteur de résistance reste compris entre 1 et 5, la souche est dite tolérante; si ce dernier est supérieur à 5, la souche est dite résistante (Kelly *et al.*, 1979 ; Kerboeuf, 1986).

### 3-2 - LES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE:

Il existe différents types de résistance (Prichard *et al.*, 1980) : simple, de famille, croisée ou multiple.

- La *résistance simple* désigne toute résistance vis-à-vis d'un composé particulier.

-La *résistance de famille* ou "*side-resistance*" (Kelly *et al.*, 1978) : désigne une résistance à plusieurs antihelminthiques appartenant à la même famille (donc possédant le même mécanisme d'action). L'exemple le plus significatif est la résistance de famille aux benzimidazoles.

-La *résistance croisée* ou "*cross-resistance*" (Hall *et al.*, 1981) : ressemble à la résistance de famille mais se caractérise par une résistance à plusieurs antihelminthiques ayant un mode d'action différent. Un helminthe devient donc résistant à plusieurs antihelminthiques, à la suite de la sélection par un antihelminthique unique. Par exemple, une souche résistante au lévamisole sans avoir été préalablement sélectionnée par des traitements au lévamisole, mais par des traitements au tartrate de pyrantel. Cette résistance croisée est difficile à différencier d'une sélection indépendante de la résistance vis-à-vis des des deux produits.

-La *résistance multiple* : représente une souche résistante à plusieurs antihelminthiques de familles différentes et de modes d'action différents. Une résistance multiple peut être une sommation de résistances simples ou bien une résistance croisée.

-La *réversion de résistance* représente la diminution de la fréquence des individus résistants à la suite d'un changement antihelminthique (arrêt de la pression de sélection).

### 3-3 - LA PSEUDORESISTANCE :

Toute insuffisance dans la maîtrise des nématodoses dans un élevage, non résolue par le traitement, ne peut être qualifiée de résistance. Il existe de nombreuses causes de pseudorésistance :

- la sensibilité des espèces de Nématodes gastro-intestinaux :

Elle est physiologiquement différente et une posologie peut être adaptée à une espèce et non à une autre. Ainsi chez une souche sensible de strongles gastro-intestinaux de l'espèce *H. contortus*, la DL<sub>50</sub> est de 0,022 µg/ml, et de 0,063 µg/ml pour *Teladorsagia circumcincta*, *in vitro*, au thiabendazole. Les pourcentages d'efficacité *in vivo* montrent des résultats similaires (sources : INRA Tours Nouzilly ; *in* Beugnet, 1991).

- un traitement mal adapté :

\* L'antihelminthique s'avère inactif sur le Nématode en question :

Ainsi chez les strongles, le composé peut être inactif sur les larves en hypobiose (*Ostertagia* ou *Oesophagostomum*), et le réveil de ces larves peut ressembler à une résistance. Les antihelminthiques ne sont pas actifs sur toutes les espèces et à toutes les doses.

\* La posologie peut être sous-évaluée :

+ par sous-dosage lors de l'estimation du poids moyen des animaux (cause fréquente de sous-dosage).

+ par un mauvais réglage du matériel d'administration (pistolet doseur), par une carence de la forme galénique ou par une voie d'administration défectueuse.

+ par une appréciation insuffisante du fabricant de la métabolisation d'un principe actif. Le métabolisme des caprins a longtemps été assimilé à celui des ovins mais il s'avère que les caprins métabolisent plus rapidement les benzimidazoles que les ovins.

La posologie ovine n'est donc pas adaptée aux caprins et semble à l'origine de pseudorésistances (Borgan *et al.*, 1987 ; *in* Beugnet, 1991).

- une erreur d'interprétation de l'efficacité du traitement :

Un traitement efficace peut être effectué sur des animaux en mauvais état général (sous-alimentation, carences polyvitaminiques), et faire évoquer une résistance en raison de l'absence d'amélioration clinique après le traitement.

- une réinfestation continue des animaux :

Elle peut expliquer l'échec des vermifugations successives.

### 3-4 - LES CARACTERISTIQUES DE LA RESISTANCE :

#### 3-4-1 - Etiologie de la résistance :

L'intérêt apporté par la connaissance des causes d'apparition de la résistance aux antihelminthiques, réside dans la découverte des mesures prophylactiques visant à les éviter. Les facteurs provoquant l'apparition et la sélection des résistances sont liés soit à l'antihelminthique, soit au parasite, soit à la physiologie de l'hôte ou aux modalités de son élevage.

##### 3-4-1-1 - Les facteurs liés à l'antihelminthique :

Dans toute population, l'existence d'individus plus ou moins résistants à une thérapeutique est prouvée. Cette variabilité dans la sensibilité au même agent chimique est due au polymorphisme génétique de chaque individu d'une même espèce. Les facteurs d'apparition des résistances liés aux antihelminthiques exercent leur action en augmentant la pression de sélection pour ne laisser subsister que les individus résistants. Il existe deux écoles concernant la capacité que possèdent certains individus à résister : 1) elle préexisterait à toute exposition à l'antihelminthique la révélant ou 2) la présence du facteur de sélection, apporté par l'utilisation de l'antihelminthique, induit les mutations.

##### 3-4-1-1-1 - L'importance de l'antihelminthique et de sa famille chimique:

Il est possible de sélectionner des résistances à tous les antihelminthiques, y compris le plus récemment introduit : l'ivermectine. Ainsi Shoop *et al.*, en 1990, effectuent une sélection en laboratoire d'un isolat de *Trichostrongylus colubriformis*, résistant aux benzimidazoles, pour la résistance à l'ivermectine. Le développement de la résistance est ici effectué en utilisant des doses d'ivermectine calculées pour réduire la production d'oeufs dans

les fèces de chaque génération de 95% en *T.colubriformis*. La première observation de la résistance est obtenue à la génération F<sub>10</sub> (De plus le traitement de la génération F<sub>16</sub> avec 50mg/kg de thiabendazole entraîne seulement 54% de réduction des oeufs et confirme donc que la résistance aux benzimidazole est stable). Novak et Vanek, en 1992 parviennent à sélectionner deux souches résistantes de *Caenorhabditis elegans* D5 et D6, après plus de 110 générations, elles sont capables de croître sur un traitement de respectivement 3 ou 2,5 mg/l, issues de la souche sauvage parentale N2 sensible à un traitement de 0,1 à 0,2 mg/l. Pour les benzimidazoles, Maingi *et al.*, en 1990, étudient les effets de la pression de sélection pour la résistance au thiabendazole sur la survie d'*H. contortus* chez le mouton. Une souche d'*Haemonchus contortus* montrant un niveau de résistance modéré au thiabendazole, est sujète à 5 sélections au thiabendazole *in vitro* et à 4 sélections *in vivo* en séquence alternée. Ceci entraîne une nette augmentation de la résistance. L'augmentation de la résistance est accompagnée par une augmentation significative de l'implantation larvaire chez le mouton. Elle est aussi accompagnée d'une pathologie plus sévère, d'un plus fort comptage des oeufs et rétablissement des vers 3 mois après l'infection. Les souches résistantes sont alors comparées avec des souches sensibles au thiabendazole. La souche sensible au thiabendazole possède la production d'oeufs la plus élevée et cause la pathologie la plus sévère ainsi que le rétablissement des vers plus élevé en comparaison avec toutes les souches résistantes, bien que la souche la plus résistante soit très similaire à la souche sensible. Ni la production d'oeufs, ni les caractéristiques biologiques des stades libres ne semblent affectés par le degré de résistance. Ceci montre que la survie initialement basse du parasite résistant en comparaison au sensible, augmente progressivement en association avec une pression de sélection aux antihelminthiques continue. Déjà en 1978, Kelly *et al.* ; en 1982, Le Jambre *et al.* ; en 1987, Mac Lean *et al.* ; et en 1988, Martin *et al.*, avaient suggéré qu'il existe une association entre les allèles qui confèrent au Nématode une résistance aux antihelminthiques et des facteurs qui déterminent la survie et la reproduction de la population parasitaire. Le résultat de cette dernière étude montre que le succès de l'implantation d'une population d'*H. contortus* croit avec l'augmentation de la sélection pour la résistance au thiabendazole. Tous les antihelminthiques sont impliqués dans un phénomène de résistance, mais ce sont surtout les benzimidazoles qui posent un véritable problème économique dans de nombreux pays, de par l'importance du phénomène liée à la grande utilisation de ces composés. En effet, les benzimidazoles possèdent des modalités d'administration pratiques, un coefficient de sécurité

élevé (Index thérapeutique = dose toxique/dose utile, supérieur à 40), et enfin, un spectre large (Nématodes digestifs et respiratoire, cestodes, petite et grande douves) surtout pour les benzimidazoles de deuxième génération (albendazole).

#### 3-4-1-1-2 - La posologie :

Le sous-dosage des antihelminthiques, peut avoir de nombreuses origines :

- *pistolet mal réglé et rejet par l'animal d'une petite quantité de la suspension administrée.* L'importance de la perte étant proportionnelle à la concentration de la suspension utilisée, en effet, plus la concentration est élevée, plus la perte d'un petit volume peut avoir des conséquences fâcheuses (Dorchies *et al.*, 1991).

- *mauvais choix de posologie pour l'espèce ou le poids de l'animal.* Ainsi le dosage Ovins et Caprins, souvent assimilé, n'est pas forcément le même ; de même l'emploi de suspension destinée aux Bovins pour les Ovins. Par mauvaise estimation du poids moyen du troupeau, l'inadéquation de la dose au poids de l'animal à traiter est la première source d'insuffisance d'action. Trop souvent l'éleveur adopte une posologie standard identique pour tous les animaux du troupeau. Les variations importantes qui existent expliquent en partie une irrégularité d'activité et le développement de résistance de parasites sensibilisés par une dose d'antihelminthique trop faible pour être létale (Dorchies *et al.*, 1990). L'ivermectine est utilisée à faible posologie pour lutter contre l'hypodermose, les minidoses employées s'avèrent insuffisantes pour éradiquer les strongles digestifs, mais suffisantes pour soumettre ces strongles à une pression de sélection (ceci reste une hypothèse car pour induire une pression de sélection, on admet qu'il faut une efficacité du principe actif comprise entre 70 et 90%, qui n'est pas atteinte contre les strongles par les doses nécessaires à éradiquer l'hypodermose).

- *fermeture de la gouttière oesophagienne lors de l'ingestion* (Beugnet, 1991).

- *variation de sensibilité des espèces de strongles* (les éleveurs australiens vermifugeaient à demi-dose pour être actifs sur *H. contortus* plus sensible que d'autres genres), (Beugnet, 1991).

- *il faut aussi éviter de traiter les animaux au moment d'un changement brutal de régime alimentaire* (Dorchies et al., 1990).

Le problème des diffuseurs à visée prophylactique sera abordé plus loin, mais on peut dire que les diffuseurs à libération continue par diffusion peuvent sélectionner des résistances par leur effet de queue marquée.

#### 3-4-1-1-3 - Le rythme de traitement :

L'augmentation de la fréquence des traitements, sur une même génération de parasites, entraîne une pression de sélection importante. Il ne faut donc pas vermifuger avec une fréquence élevée, surtout si elle correspond à la période prépatente du strongle (Mac Kellar, 1988, *in* Beugnet, 1991). On préférera donc les traitements tactiques adaptés en fonction des données climatiques et prenant en compte la connaissance du nombre de larves infectantes dans le milieu.

#### 3-4-1-1-4 - Influence des traitements antihelminthiques sur l'infestation ou la réinfestation par les strongles :

Il est conseillé lorsque l'on traite des animaux de les mettre ensuite à l'abri de la réinfestation. Dans la pratique, cela n'est pas toujours possible, soit parce que l'éleveur ne dispose pas de pâtures totalement saines, soit parce que le degré de contamination des parcelles est sous-estimé. Les animaux se réinfestent donc et il est alors important de savoir si le(s) traitement(s) a ou non amoindri leur protection vis-à-vis de l'infestation. L'acceptation de l'hypothèse que l'immunité contre les strongles peut s'apparenter à une "prémunition", a d'abord entraîné l'idée que les traitements, en éliminant la population parasitaire, feraient du même coup disparaître la protection de l'animal. Certains auteurs montrent que dans certaines conditions expérimentales, les traitements pouvaient avoir des conséquences néfastes

pour l'immunité. Mais la réalité, d'après Kerboeuf (1987), montre que si l'on diversifie un peu les modalités de traitement et d'infestation, les effets de l'administration d'antihelminthiques sur les réinfestations, sont beaucoup plus complexes que l'on ne pouvait l'imaginer au départ.

D'après Kerboeuf, il faut donc distinguer :

- les traitements réduisant l'acquisition de l'immunité (traitements multiples rapprochés et à haute dose). Cet effet est probablement dû à l'absence de contact suffisant entre l'hôte et le parasite. L'effet est d'autant plus marqué que l'efficacité est de 100%.

- les traitements débarrassant un animal potentiellement immun d'une population de vers et qui permettent à la protection de s'exprimer pendant un certain temps.

En conclusion, la protection peut être :

- supprimée partiellement (50% de protection par rapport aux témoins), par des traitements trop nombreux, trop rapprochés et à haute dose.

- potentielle mais non exprimée, les animaux sont infectés, parfois lourdement, mais si on les débarrasse de leur vers par un traitement, ils développent une forte réaction vis-à-vis d'une réinfestation.

- exprimée, probablement après un temps de latence relativement long.

A condition d'être employés modérément et judicieusement, les traitements antihelminthiques peuvent aider à révéler un état immunitaire non exprimé sans traitement.

#### 3-4-1-1-5 - L'alternance des produits :

- Il est dangereux d'employer plusieurs antihelminthiques à mode d'action différents sur une même génération de strongles digestifs adultes, sous peine de sélectionner des souches multirésistantes (Par exemple la souche d'*O. circumcincta* (*T. circumcincta*) isolée par Le Jambre, résistante au thiabendazole, au tartrate de morantel et au lévamisole).

- Il est aussi dangereux de n'employer systématiquement que le même principe actif, leurs métabolites ou leur prodrogue, sans jamais changer de famille chimique, ni de mode d'utilisation (Dorchies *et al.*, 1990).

- L'alternance d'un dosage avec un produit à effet ponctuel et une substance à effet résiduel ou un système intraréticulaire à libération continue, permet de bien gérer les principes actifs en prolongeant leur durée d'utilisation (Dorchies *et al.*, 1990).

### 3-4-1-2 - Les facteurs liés au parasite :

La résistance aux antihelminthiques et principalement celle aux benzimidazoles ne va pas apparaître chez toutes les espèces de Nématodes présents dans le tube digestif de l'hôte. Il existe donc des facteurs de résistance intrinsèques au parasite (dans ce descriptif nous nous limiterons à l'étude des strongles sur les ruminants, sujet le plus étudié et le mieux connu).

#### 3-4-1-2-1 - Caractéristiques physiologiques parasitaires :

Les Nématodes les plus étudiés et les plus représentatifs du problème de la résistance sur les troupeaux, appartiennent au sous-ordre des *Trichostrongylidea*, et plus précisément, à la famille des *Trichostrongylidae*.

##### \* La prolificité :

Une espèce prolifique donne naissance à une descendance importante et le génome parasite offre alors une plus grande capacité de sélection. *Haemonchus* est un genre se caractérisant par une remarquable prolificité. Ainsi *H. contortus* représente le genre prédominant en matière de résistance puisqu'elle est apparue très tôt sur cette espèce et s'est généralisée à toutes les familles d'antihelminthiques. En effet les femelles d'*Haemonchus* pondent des milliers d'oeufs par jour (De 5 à 10000 oeufs/jour) ainsi que les femelles d'*Oesophagostomum* (12000 oeufs/jour) alors que les femelles de *Trichostrongylus* n'en pondent que 200/jour. Mais la prolificité n'est pas le seul critère entrant dans l'apparition de la chimiorésistance, car contrairement à *Haemonchus* et *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* possède peu de souches résistantes (Beugnet, 1991).

##### Exemple de l'apparition de la résistances chez *H. contortus* :

La résistance à la phénothiazine a été décrite dès 1957 par Drudge *et al.*, puis par Drudge, en 1959, et enfin par Enzie en 1963. Cette résistance émerge après l'emploi de faibles doses prophylactiques sur le long terme. Pour les benzimidazoles, Drudge *et al.*, en 1964 remarquent une résistance au thiabendazole, redéfinie par Partosoedjono *et al.*, en 1969 (*in* Rolfe, 1990). La résistance émerge alors après une exposition minimale à l'antihelminthique montrant la probabilité importante de la présence d'un génome résistant avant la sélection par cet antihelminthique. Smeal en 1968 localise une résistance au

thiabendazole d'*H. contortus* dans trois fermes de la région de Nouvelle-Angleterre du New South Wales Australien, confirmée plus tard par Webb *et al.*, en 1979 et Green *et al.*, en 1982 (*in* Rolfe, 1990). Une fréquence importante de traitements reste toujours liée au développement de cette résistance (Barton, 1980 ; *in* Rolfe, 1990). En Nouvelle-Zélande, la première résistance du parasite fut décrite par Vlassof *et al.*, 1980 (*in* Rolfe, 1990), et confirmée par une étude montrant une résistance dans 20% des fermes ovins en 1982 (Kemp *et al.*, 1982 ; *in* Rolfe, 1990) et une situation plus dramatique pour les élevages caprins (Kettle *et al.*, 1983 ; *in* Rolfe, 1990). En Europe le développement de la résistance d'*H. contortus* reste plus lent et moins important (Jordi *et al.* ; Boersema *et al.*, 1982 ; Cawthorne *et al.*, 1984 ; Kerboeuf *et al.*, 1985 ; *in* Rolfe, 1990).

Pour l'ivermectine, l'émergence d'une résistance a été montrée par Carmichael *et al.*, (*in* Rolfe, 1990) en Afrique du sud après traitements réguliers de 3 à 5 semaines d'intervalles. Van Wyk *et al.*, en 1988 et 1989, et Echevarria et Trindate, en 1989 décrivent respectivement des résistances en Afrique du sud et en Amérique du sud.

Pour les salicylanilides, qui sont employés en alternance avec l'ivermectine et le lévamisole pour le contrôle des haemonchoses résistantes aux benzimidazoles et possédant l'avantage d'avoir un spectre étroit avec une activité contre les parasites intestinaux ingérant du sang ou montrant une association étroite avec le sang, une résistance a émergé en Afrique du sud (Van Wyk *et al.*, 1980, 1982, 1987, 1988, 1989 ; *in* Rolfe, 1990), et en Australie (Rolfe, 1990).

Une résistance au lévamisole n'a pas été mise en évidence pour *H. contortus*, malgré sa large utilisation sur plusieurs années. Cependant Green *et al.*, en 1981, 1982 démontrent une résistance chez les chèvres, mais le lévamisole semble posséder une efficacité insuffisante chez ces dernières en comparaison avec les moutons (Gilham et Obendorf, 1985 ; *in* Rolfe, 1990).

Pour les organophosphorés et surtout le naphthalophos, dernièrement réintroduit, qui sont largement utilisés en Australie, principalement où la résistance aux antihelminthiques à large spectre est importante, aucune résistance d'*H. contortus* n'a été signalée.

\* Le temps de génération :

La durée totale du cycle de développement du parasite est un facteur à prendre en compte. Si cette durée est brève, plusieurs générations peuvent se succéder au cours d'une

années. Le temps de génération représente la durée nécessaire pour donner naissance à une seconde génération. Les modifications génomiques et la capacité de sélection d'une sous-population seront inversement proportionnelles à ce temps de génération. Les espèces les plus résistantes seront celles possédant un temps de génération bref comme les vers de la famille des *Trichostrongylidae* (principalement du genre *Haemonchus* et *Trichostrongylus*), ou de la famille des *Cyathosomidae* chez les équidés.

Le temps de génération peut se décomposer en trois phases :

- la *période prépatente* est la durée séparant l'infestation de l'animal par les larves infectantes et l'apparition des nématodes adultes sexuellement matures.

- le *temps d'évolution des larves dans le milieu extérieur* étant la durée de développement de la larve de stade 1 à la larve infectante de stade 3. Au cours de cette période, les larves ne sont plus soumises à la pression de sélection liée à la chimiothérapie de l'hôte et plus ce temps est court, plus les générations sont à même de se succéder rapidement. Ce temps d'évolution est variable en fonction des facteurs climatiques.

- le *temps de survie du stade infectant* est important pour le "turn over" parasitaire et la pression de sélection par les antihelminthiques. Que le stade infestant survive ou non, l'essentiel est qu'il puisse réinfester les animaux (il existe une relation entre le pouvoir infectant et la résistance). Concernant les élevages extensifs comme en Australie, ou en Nouvelle-Zélande, la période prépatente des vers est courte mais il faudra un long temps de survie des larves dans le milieu extérieur car la probabilité qu'un animal païsse à cet endroit précis est très faible de par l'importance des propriétés. Dans les pays secs, la contamination des prairies est répartie aux alentours des points d'eau. Pour *H. contortus* la période prépatente est de trois semaines, le temps de développement des larves de une à deux semaines et la survie des L<sub>3</sub> d'environ six mois. Ce genre est donc particulièrement sensible aux pressions de sélection (Smeal *et al.*, 1968 ; Beugnet, 1991).

### \* Les caractéristiques physiopathologiques :

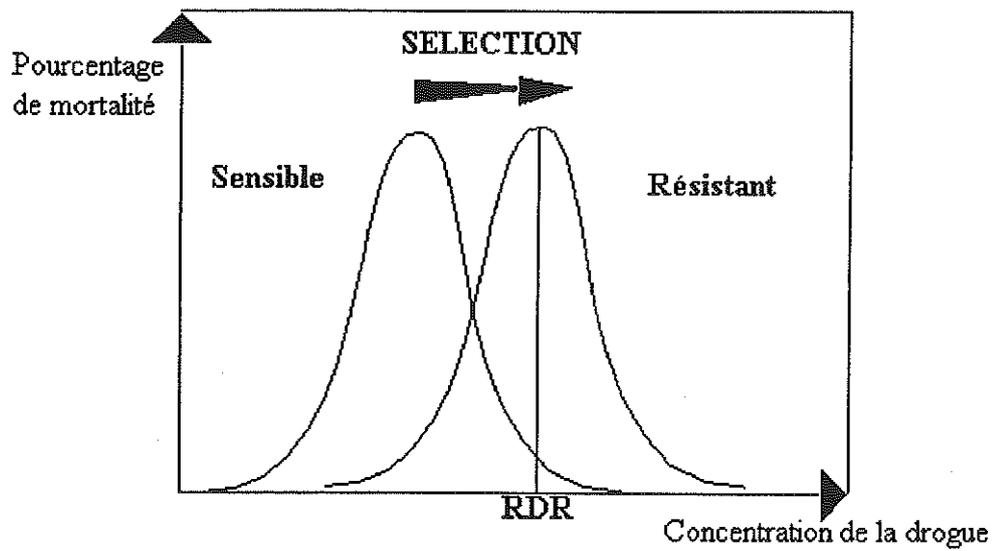
Kelly *et al.*, (in Beugnet, 1991), en 1978 démontrent que la résistance peut être en relation avec certaines caractéristiques physiopathologiques des Nématodes pouvant participer à la pression de sélection des individus résistants. En effet les souches résistantes se caractérisent par une plus grande difficulté pour l'hôte à les éliminer, ainsi qu'une fécondité, un taux d'éclosion des oeufs, un pouvoir infectant et une viabilité plus élevés que les souches sensibles. Kerboeuf *et al.*, en 1989, notent des variations dans le pouvoir infectant des L<sub>3</sub> et dans la prolificité et le temps de développement des vers adultes. Il est évident que ces caractères sont génétiquement liés à ceux responsables de la résistance aux antihelminthiques. Vis-à-vis des animaux parasités, le pouvoir pathogène à taux d'infestation égal semble accru pour les souches résistantes. Pour *H. contortus*, les agneaux parasités par une souche résistante montrent une anémie plus accusée (Le Jambre *et al.*, 1982 ; Kelly *et al.*, 1978 ; Beugnet, 1991).

### 3-4-1-2-2 - Génétique parasitaire et résistance :

Le développement de la résistance est la conséquence d'une pression de sélection. Les études des souches résistantes isolées sur différents élevages et sur différentes espèces hôte, permettent de penser que la résistance est génétiquement déterminée. Plusieurs antihelminthiques sont chimiquement non persistants, exposant seulement la composante parasitaire de la population de Nématodes à la drogue. La dose traitante d'antihelminthique recommandée est discriminatoire, tuant entre 95 et 99% de la population dès la première exposition. Le petit nombre de vers survivants, qui est la composante la plus résistante de la population, a l'opportunité de contribuer à la prochaine génération de vers. De cette façon, la sélection pour la résistance s'effectue sur les limites supérieures du domaine phénotypique de la tolérance à la drogue (figure No. 1). La courbe normale de distribution pour la tolérance suggère que des composantes génétiques et/ou environnementales influencent la tolérance individuelle du ver et que tout effet génétique peut être contrôlé polygénétiqument. La réponse à la sélection est une balance entre la contribution de :

- 1) des vers résistants aux générations ultérieures
- 2) des vers non-exposés sur la pâture, pendant le traitement et ultérieurement ingérés par les hôtes.

**Figure No. 1 - La sélection pour la résistance :**



La sélection pour la résistance résulte de l'usage d'un anthelminthique au dessous de la DL100. La dose recommandée par le fabricant (RDR) est létale pour 99% de la population sensible. Un traitement continu entraîne une direction de sélection vers une population résistante dans laquelle le RDR est létal pour un petit nombre de vers.

La relative lenteur de l'apparition de populations résistantes à certains antihelminthiques (six à huit ans après leur mise sur le marché) reste en faveur d'un mécanisme de résistance polygénique (Le Jambre, 1985 ; *in* Beugnet, 1991). Le Jambre *et al.*, en 1979 (*in* Martin *et al.*, 1990), démontrent la polygénéité de la résistance sur une population d'*H. contortus* résistante au thiabendazole. Ce modèle polygénique expliquerait l'augmentation des allèles récessifs nombreux intervenant dans la résistance. Toujours d'après Le Jambre (1985), cette augmentation se ferait au cours d'une sélection lente et progressive. Le modèle polygénique a été proposé par Herlich *et al.*, en 1981 (*in* Martin P.J., 1990) pour expliquer la résistance d'*H. contortus* au cambendazole, mais cette résistance serait probablement héritée récessivement par la substitution d'un allèle sur un simple *locus*. Martin *et al.*, en 1988, démontrent la polygénéité pour la résistance au thiabendazole de *T. colubriformis*. Waller *et al.*, en 1985 et Dobson *et al.*, en 1987 (*in* Martin et McKenzie, 1990), approuvent la théorie que la résistance au lévamisole serait sous le contrôle d'un gène unique dominant. D'autres modèles, comme l'utilisation régulière à dose forte de thiabendazole par Hall *et al.* (*in* Beugnet, 1991), conduisent à la présentation d'une hypothèse de résistance liée à un gène dominant à plusieurs allèles.

Un gène de résistance au lévamisole a été découvert par Martin *et al.*, en 1990 sur *T. colubriformis*. Il s'agirait d'un caractère récessif lié au chromosome sexuel (la détermination sexuelle chez les Nématodes est XX pour la femelle et X pour le mâle) ; (John, 1957 ; *in* Martin P.J., 1990). Des croisements réciproques entre une souche sensible et une souche résistante au lévamisole de *T. colubriformis* produisent une descendance  $F_1$  compatible avec le fait que la résistance soit l'héritage d'un caractère récessif sexuel. Une forte résistance est visible pour les  $F_1m$  mâles ( $p$  et  $m$  indiquent que la résistance est originaire du parent respectivement paternel ou maternel) tandis que les  $F_1m$  femelles sont sensibles, ceci suggérant que la résistance est associée à un unique chromosome X originaire du parent maternel résistant. De plus, les femelles hétérozygotes sont sensibles de façon prédominante, indiquant que la résistance serait récessive chez les hétérozygotes homogamétiques. L'état de résistance de la descendance du "back-cross" de la génération  $F_1$  avec les souches parentales confirme cette hypothèse. Ces résultats sont compatibles avec le fait que la résistance puisse être contrôlée par un gène unique, ou un groupe de gènes étroitement liés, mais indique aussi que d'autres *loci* sur les autosomes (chromosomes autres que sexuels) exercent un effet mineur. Ces résultats sont en contradiction avec les

observations que la résistance aux benzimidazoles est autosomique et polygène. Le lévamisole est un agoniste de l'acétylcholine agissant directement sur le récepteur de la jonction neuro-musculaire (Behm *et al.*, 1985). Les souches résistantes paraissent avoir moins de récepteurs que les souches sensibles (Lewis *et al.*, 1980 ; Sangster *et al.*, 1988 ; *in* Martin et McKenzie., 1990). La survie réduite des souches mutantes résistantes au lévamisole semble due à la perte de ces récepteurs à l'acétylcholine. Des études pharmacologiques de la résistance au lévamisole chez le Nématode libre *Caenorhabditis elegans*, montrent un haut degré de résistance chez les mutants ayant perdus la plupart de l'activité des récepteurs à l'acétylcholine présents dans la souche sauvage Lewis *et al.*, 1980, (*in* Martin et McKenzie, 1990). Pour *C. elegans*, les deux gènes conférant un bas niveau de résistance sont sur le chromosome X (Lewis *et al.*, 1980 ; *in* Martin et McKenzie., 1990). Mais le modèle que représente *C. elegans* est incomplet pour expliquer la résistance se développant par le traitement antihelminthique chez le mouton. En effet, si les souches résistantes au lévamisole de *C. elegans* sont aussi résistantes aux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Lewis *et al.*, 1980 ; *in* Martin et McKenzie, 1990), par contre les souches hautement résistantes d'*Ostertagia sp.* sont sensibles à un inhibiteur de l'acétylcholinestérase comme le naphthalophos (Le Jambre et Martin, 1979 ; *in* Martin et McKenzie, 1990). Malgré tout, le mode d'action du lévamisole des deux espèces apparaît similaire.

Les situations monogène/polygène ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives. L'argument est mieux représenté en fonction de l'issue de l'évolution la plus probable donnant un profil de sélection particulier. Ainsi, pour les insecticides, la résistance polygène peut aboutir si les insecticides sont appliqués à des concentrations initialement basses, mais croissantes, technique semblable aux modèles de sélection de la résistance aux antihelminthiques (Brown et Pal, 1971 ; Georghiou, 1972 ; *in* Martin P.J., 1990). L'apparition d'un gène majeur de résistance aux insecticides semble plus être le reflet d'une forte intensité de sélection qu'une variation génétique dans la population d'insectes (Roush et Hoy, 1987 ; *in* Martin P.J., 1990).

#### \* Evolution de la résistance :

La compréhension de l'héritage de la résistance et du degré de récessivité, en respectant la survie, suggère que la fréquence d'apparition du gène de résistance est basse, et que des doses élevées d'antihelminthiques rendent cette résistance effectivement récessive et retardent son début. Les doses élevées qui sont létales pour les hétérozygotes peuvent

supprimer les allèles résistants par le traitement. Les fabricants recommandent des doses d'utilisation des antihelminthiques permettant normalement la survie d'un petit nombre de survivants. Si la résistance est polygénique, il est probable que la proportion de ces survivants supporte certains, mais pas tous, des allèles contribuant à l'expression ultime de la résistance. Plus l'efficacité des antihelminthiques est importante, moins les gènes de résistance vont persister. Dans le cas de la résistance récessive du lévamisole liée au chromosome sexuel, de fortes doses peuvent prévenir l'accumulation de femelle hétérozygotes phénotypiquement sensibles dans la population, mais pas des mâles phénotypiquement résistants avec un chromosome X unique.

#### 3-4-1-2-3 - Les bases moléculaires de la résistance :

Les principaux mécanismes de résistances sont regroupés en quatre systèmes intrinsèques (Prichard *et al.*, 1983) :

- une réduction de l'absorption de l'antihelminthique.
- l'apparition ou la préexistence de voies métaboliques parallèles suppléant le site d'action de l'antihelminthique ou détoxifiant l'organisme parasité.
- l'augmentation quantitative des sites d'action nécessitant des doses supérieures pour les neutraliser.
- la diminution ou la perte de la sensibilité du site d'action aux antihelminthiques.

##### \* Une réduction de l'absorption de l'antihelminthique :

On ne sait pas pour l'instant, si les antihelminthiques courants sont absorbés par une ingestion orale (du sang de l'hôte ou de son contenu intestinal) ou par la surface tégumentaire externe (ou les deux). Thompson *et al.*, en 1993, font le point sur les approches mécaniques pour quantifier l'absorption d'antihelminthiques des Nématodes gastro-intestinaux. De nombreuses études ont examiné les mécanismes par lesquels les antihelminthiques étaient absorbés. Verhoeven *et al.*, en 1980 (*in* Thompson *et al.*, 1993) montrent que l'accumulation du lévamisole par *A. suum* peut être expliquée par la seule diffusion transtégumentaire. Ces études indiquent l'importance des barrières lipidiques et suggèrent que le tégument est un site d'absorption de la drogue. La barrière principale à l'absorption de nombreuses drogues est

lipidique, et l'absorption augmente généralement de façon logarithmique avec la lipophilie jusqu'à ce que le log K (coefficient de partition *n*-octanol/eau) atteigne 2,5 (Thompson *et al.*, 1993). L'accumulation de la drogue dans les tissus parasitaires jusqu'à des niveaux dépassant largement ceux du milieu environnant, est aussi liée au degré de lipophilie. Pour les drogues de haut poids moléculaire, comme l'ivermectine, le degré d'absorption est plus lent que celui prédit par le calcul du logK seul, car il est dû à la restriction de taille imposée par les petits pores aqueux de la matrice du collagène. Les drogues ayant un poids moléculaire supérieur à 3000 Da ne peuvent pas être absorbées par la voie transtégumentaire ; il est donc possible qu'elles pénètrent par l'intestin suivant l'absorption par le parasite. Le microenvironnement des pores tégumentaires favorise l'absorption des acides faibles de  $pK_a > 5$  et des bases faibles de  $pK_a < 5$ . Le pH du contenu de la lumière intestinal de l'hôte est moins un facteur déterminant le rapport formes ionisées/non-ionisées des acides et bases faibles que le pH du microenvironnement des pores tégumentaires. Seulement la fraction non-ionisée peut diffuser à travers la barrière lipidique, mais le microenvironnement peut largement influencer le coefficient de perméabilité.

*\* L'existence de voies métaboliques parallèles :*

Ultérieurement développé dans le chapitre traitant de la fumarate réductase, ce mécanisme est connu pour la résistance de certaines souches de strongles aux benzimidazoles. En effet Rew *et al.*, en 1982, puis Bennet et Bryant, en 1984 et Sangster *et al.*, en 1985 montrent que des souches de strongles résistantes ont un métabolisme glucidique différent avec une utilisation différente du glucose par des voies indépendantes des fermentations anaérobies utilisant habituellement la fumarate réductase. Ces souches résistantes utiliseraient plus les voies aérobies incluant un cycle de l'acide tricarboxylique que les voies anaérobies bloquées par les benzimidazoles.

\* L'augmentation quantitative des sites d'action nécessitant des doses supérieures :

Ceci semble être une des caractéristiques de la résistance aux antihelminthiques anticholinestérasiques ou cholinergiques comme les organophosphorés, le lévamisole, le pyrantel-morantel mais aussi pour la résistance aux benzimidazoles. Certaines activités enzymatiques sont alors augmentées chez les souches résistantes et particulièrement les activités estérasiques comme l'acétylcholinestérase (Taylor et Hunt, 1989).

\* Une modification de l'activité ou de la structure des sites d'action :

De même une résistance peut être associée avec une perte partielle de récepteurs, ainsi pour le lévamisole, des études pharmacologiques ont montré qu'un fort degré de résistance chez *C. elegans*, était associé avec une perte de l'activité des récepteurs à l'acétylcholine présents dans la souche sauvage (Lewis *et al.*, 1980 ; *in* Martin *et al.*, 1990).

Des modifications spatiales des sites permettent d'envisager que les liaisons avec les antihelminthiques soient limitées ou absentes. Ainsi, le site de liaison à la tubuline  $\beta$ , site d'action des benzimidazoles, serait structurellement modifié (développement dans le chapitre n°4), interdisant la fixation de la molécule antihelminthique et n'empêchant plus la polymérisation des microtubules (Lacey, 1988). Roos, en 1990, rassemble les différentes données concernant l'origine moléculaire de la résistance aux benzimidazoles des helminthes. L'analyse des gènes codant pour les tubulines à l'aide de la technique de comparaison des fragments de restriction polymorphe (RFLP) montre que les souches résistantes ne possèdent plus qu'un seul fragment de 9 kilobases (alors que les souches sensibles possèdent, elles, plusieurs fragments : jusqu'à cinq dont le fragment de 9 kilobases). Cette étude, en plus de prouver les modifications moléculaires de la tubuline  $\beta$  entre souches résistantes et sensibles, montre que la résistance résulte d'une sélection de certains individus possédant l'allèle codant pour la tubuline résistante et permet donc de formuler l'hypothèse que ce gène préexisterait chez les Nématodes avant tout contact avec l'antihelminthique.

3-4-1-3 - Les facteurs de résistances liés aux conditions d'élevage des animaux et au climat :

#### 3-4-1-3-1 - Les espèces hôtes concernées :

Les bovins, les ovins, les caprins, les porcins et les équins sont particulièrement touchés. Ces animaux sont élevés dans certaines parties du monde de façon extensive et en grandes unités. Un troupeau ovin australien nécessite 200000 têtes pour être rentable. Ces conditions d'élevage expliquent l'importance économique du phénomène de résistance dans certaines parties du monde comme l'Australie, la Nouvelle-Zélande et l'Afrique du sud. Dans les pays européens, l'élevage est plutôt intensif mais il se pratique souvent à l'extérieur avec une charge animale à l'hectare favorisant une forte infestation des prairies en larves et un parasitisme gastro-intestinal important.

#### 3-4-1-3-2 - La conduite de l'élevage :

- *Le traitement des brebis avant agnelage* est systématiquement effectué afin d'empêcher l'augmentation du taux de ponte des strongles en *peripartum* ("post parturiant egg rise"), et réalise une présélection des strongles résistants. Si les agneaux restent avec les mères, ils pourront s'infecter et, restant plus sensibles à l'infestation, permettront la multiplication des strongles sélectionnés.

- *Le mélange de différentes espèces sur les pâtures*, surtout développé pour les ovins et caprins, est à éviter. En effet, les caprins semblent sélectionner plus facilement les strongles résistants (Borgan *et al.*, 1987 ; *in* Beugnet, 1991), et favorisent donc l'extension de la résistance chez les ovins. Ceci serait peut être dû à un sous dosage courant chez les caprins qui métabolisent plus rapidement les benzimidazoles.

- *Les erreurs thérapeutiques dans la vermifugation*, citées plus haut, sont aussi un point important favorable à l'apparition des résistances (Dorchies *et al.*, 1990).

-*Les conditions climatiques*, en agissant sur le développement des stades libres, jouent également un rôle important sur le "turn-over" parasitaire. C'est une des raisons pour lesquelles les résistances aux antihelminthiques sont devenues un phénomène prépondérant dans les pays tropicaux, dont les DOM-TOM français (Bastien *et al.*, 1989). Il est à remarquer que le temps d'évolution des larves dans le milieu extérieur, un des constituants du temps de génération, est particulièrement court pour les espèces tropicales adaptées à un environnement adéquat chaud et humide (Martinique : température minimale de 23°C,

pluviométrie supérieure à 1500 mm d'eau par an). Ainsi, les oeufs d'*H. contortus* évoluent en L<sub>3</sub> en huit jours ou moins.

### 3-4-2 - Evolution, persistance et réversion de la résistance, tentatives de modélisation mathématique :

Le suivi d'une population résistante et les méthodes de lutte envisageables, sont actuellement étudiés par des méthodes de modélisation mathématique. Ces dernières reproduisent l'évolution quantitative des adultes dans le tractus digestif, de leur ponte en fonction de la période latente, des larves dans le milieu extérieur. Les modèles prennent en compte le caractère polygénique de la résistance et étudient les moyens de lutte thérapeutiques ou écologiques. Ces modélisations mathématiques ont permis de s'apercevoir qu'en diluant une souche résistante avec une souche sensible de même espèce, on pouvait diminuer et même éliminer cette souche résistante. Ceci effectue un brassage génétique et une diminution progressive de la DL<sub>50</sub> mesurée par un test d'inhibition d'éclosion des oeufs en présence de benzimidazoles (Hall *et al.*, 1983, *in* Beugnet, 1991). Cette technique de dilution des populations s'affirme comme une mesure prophylactique visant à diminuer la fréquence des individus résistants dans une espèce de strongles présent dans un élevage. Ces modélisations peuvent jouer un rôle majeur dans la prévention des strongyloses gastro-intestinales car certains étudient la gestion des pâturages (technique de rotation et de changement de pâture, de traitement avant de changer les animaux de pâture, de pâturage des jeunes avant les adultes). L'utilisation des formes galéniques à diffusion lente d'antihelminthiques a, elle aussi, été modélisée, et il semblerait que ces formes galéniques ne provoquent pas l'apparition de résistance, à condition que les bolus provoquent une chute brutale du taux sérique d'antihelminthiques dès que leur action s'arrête. et diminuent même notablement l'incidence économique des strongyloses (Barnes et Dobson, 1990). Barnes développe un modèle applicable sur *T. colubriformis*, pour simuler la population, son niveau de résistance aux antihelminthiques courants, la mortalité de l'hôte et l'immunité acquise.

Un modèle plus général étudie le cycle de vie des *Trichostrongylidae* et indique que l'alternance des molécules antihelminthiques à modes d'action différents est une stratégie moins efficace vis-à-vis de la prévention de l'apparition de résistance, que la stratégie consistant à administrer simultanément plusieurs antihelminthiques agissant différemment

(Smith, 1990). Ce modèle est en contradiction avec d'autres auteurs, craignant l'apparition de multirésistance.

*La réversion de la résistance* est le retour des  $DL_{50}$  aux valeurs correspondant aux souches sensibles de même espèce et issues d'un même mammifère hôte. Des individus résistants existent naturellement dans toute population, génétiquement hétérogène. Ils sont sélectionnés et progressivement la population devient génétiquement homogène, ne renfermant que des individus résistants. Pour que la réversion soit possible, il faut que les allèles responsables de la sensibilité aux antihelminthiques soient présents dans la population parasitaire de l'élevage devenue presque génétiquement homogène du point de vue des loci intéressant la résistance. Il n'y a aucune raison pour que cette population, devenue homozygote vis-à-vis d'un groupe de gènes particuliers puisse redevenir sensible. Les successions des générations se font par accouplement entre individus homozygotes vis-à-vis de la résistance, et les générations successives sont toujours résistantes. Sinon un apport de diversité génomique pourra être effectué afin de diluer les individus résistants (Hall *et al.*, 1983 ; Martin *et al.*, 1987 ; *in* Beugnet, 1991). La réversion de la résistance est un phénomène lent et difficile. L'intensité des résistances rencontrées, la multiplicité des espèces résistantes et le nombre d'antihelminthiques concernés expliquent la difficulté de la réversion.

Le très bas taux de réversion décrit pour les Nématodes suggère qu'il serait futile de faire confiance en un retour de la sensibilité par la sélection naturelle (Le Jambre *et al.*, 1982 ; Hall *et al.*, 1982 ; Martin *et al.*, 1988 ; *in* Martin, 1990). Dans une étude sur pâtures conduites sur quatre ans, la résistance aux benzimidazoles chez *Ostertagia* ne réduit jamais sous la sélection naturelle, mais, lorsque le lévamisole est utilisé, une baisse significative de la résistance au benzimidazole apparaît (Martin *et al.*, 1988 ; *in* Martin, 1990). Cependant, le degré de la tolérance au benzimidazole demeure trop élevé pour réintroduire ce composé pour le contrôle parasitaire et une résistance au lévamisole se développe alors durant cette période expérimentale. Les stratégies de contrôle parasitaire ont proposé une rotation annuelle des antihelminthiques efficaces. Le succès de ces stratégies est dépendant de la réversion de la résistance d'un des composés pendant l'utilisation des autres. L'évidence empirique jette le doute sur la vraisemblance de cette hypothèse lorsque la résistance atteint un haut niveau (Martin *et al.*, 1988 ; *in* Martin 1990). mais la rotation semble être une option favorable lorsque la résistance est faible (Maingi *et al.*, 1990). Il est possible d'augmenter le taux de

réversion par l'introduction d'individus sensibles dans une population résistante. Cette approche a été étudiée avec succès sur *H. contortus* (Van Wyk et Van Schalkwyk, 1990 ; *in* Martin, 1990). L'augmentation de la réversion peut avoir une application pratique puisqu'elle peut permettre la réintroduction d'un antihelminthique avec un profil de sélection différent, par exemple, en association avec un autre composé ou un dispositif à libération contrôlée.

Plus que le contrôle de la résistance, une meilleure approche est d'adopter des stratégies préservant la sensibilité. Une attaque multiple : par des traitements chimiques combinés, de durée limitée et incorporant de fortes concentrations peut aboutir à cet objectif (Daly, 1990 ; *in* Martin, 1990). Par essence, la combinaison d'antihelminthiques pour lesquels la résistance est génétiquement non liée, peut être vue comme une manière d'augmenter le degré de "polygénicité" de la résistance. Martin, en 1990 cite l'exemple du succès de la combinaison du lévamisole avec les benzimidazoles dans la prévention de l'apparition de la résistance. Ensuite, des études sur pâtures en utilisant le benzimidazole et le lévamisole combinés, ou un autre antihelminthique comme le naphthalophos, montrent la capacité des combinaisons à contrôler le problème des résistances (Anderson *et al.*, 1988, 1990 ; *in* Martin, 1990). Martin propose de conserver des animaux non-traités au sein du troupeau ; ces animaux permettraient la survie d'individus sensibles et entretiendraient un brassage génétique au sein de la population vermineuse. De même, Van Wyck *et al.*, en 1990 (*in* Beugnet, 1991), proposent d'infecter le troupeau par des strongles sensibles, essai probant avec une souche d'*H. contortus* chez le mouton.

*Chapitre quatrième*

**METHODES DE MISE EN EVIDENCE ET D'ETUDE DE LA  
RESISTANCE**

Dans ce chapitre nous verrons les principales techniques de détection des résistances, en différenciant bien les techniques *in vivo* des techniques *in vitro* et des essais biochimiques. L'importance de ces techniques, principaux outils de diagnostic des résistances, en fait une des voies fondamentale de recherche de nombreux laboratoires spécialisés.

#### **4 - METHODES DE MISE EN EVIDENCE ET D'ETUDE DE LA RESISTANCE AUX ANTIHELMINTHIQUES DES NEMATODES GASTRO-INTESTINAUX :**

Des essais spécifiques, s'effectuant *in vivo* et *in vitro*, permettent d'acquérir la certitude d'une résistance aux antihelminthiques. Il faut distinguer les essais de mise en évidence de ces résistances, des essais biochimiques, ces derniers s'avérant le plus souvent des méthodes d'analyse moléculaire des phénomènes de résistance.

Le développement de ces essais doit prendre en compte plusieurs critères pour être applicables en routine :

- méthodes diagnostiques de mise en oeuvre rapides et faciles
- coût peu élevé
- reproductibles quels que soient le manipulateur et le laboratoire
- possibilité de comparaison des résultats

#### 4-1 - LES ESSAIS IN VIVO :

##### 4-1-1 - Le bilan parasitaire :

Le protocole est le suivant :

Des lots d'animaux aussi homogènes que possible sont infectés par la souche ou l'association de Nématodes à étudier et sont traités par des doses croissantes de l'antihelminthique choisi. La date de traitement est choisie en fonction de l'activité antihelminthique connue du produit. Un témoin non traité est toujours conservé. Les animaux infestés sont abattus six jours après le traitement et une comparaison des charges parasitaires selon la posologie employée, permet le calcul de la  $DL_{50}$  et ensuite d'évaluer le degré de résistance. Ce type de bilan parasitaire n'est pas spécifique de la détection de résistance, mais il reste la méthode de base pour comparer l'efficacité de deux antihelminthiques et apprécier la posologie à indiquer aux éleveurs. Ces essais sont toujours effectués avant la mise sur le marché de nouveaux antihelminthiques. Les deux principaux défauts de ce bilan parasitaire résident dans sa trop longue durée de réalisation (trois semaines pour la période prépatente puis une semaine après le traitement) ainsi que dans son prix de revient trop élevé (bien que la réalisation de ce bilan chez l'éleveur, avec un lot traité et un lot témoin non traité et en effectuant le bilan sur tractus digestifs à l'abattoir, soit moins onéreuse). Pour ces deux raisons, la recherche d'animaux de laboratoire capables d'héberger des Nématodes (strongles digestifs) de petits ruminants, a été vivement encouragée. Le cobaye est actuellement utilisé comme hôte de *T. colubriformis*, et les laboratoires HOECHST ont développé la gerbille de mongolie (*Meriones unguiculatus*) pour l'étude des souches d'*Haemonchus sp.*, de *Trichostrongylus sp.* et de *Teladorsagia sp.*. Mais cette variation dans les hôtes n'est pas sans inconvénient car la métabolisation des antihelminthiques chez les rongeurs s'avère différente des ruminants. Chez les ruminants, le rumen se comporte comme un volant de distribution de l'antihelminthique entraînant une action prolongée sur les Nématodes et l'utilisation de rongeurs peut provoquer un dépistage de fausses résistances pour *T.colubriformis* (Beaumont-Schwartz *et al.*, 1989) (Hubert *et al.*, 1980 ; *in* Beugnet, 1991).

#### 4-1-2 - Essai par coproscopie :

Pour réaliser cet essai, une coproscopie et une coproculture sont effectuées sur des animaux vierges de tout traitement depuis, au moins, quatre semaines. Chaque lot (constitué par exemple par classe d'âge et par conduite de reproduction) nécessaire à l'étude est composé d'au minimum dix animaux. Le jour du prélèvement, les animaux sont traités avec le produit à étudier. Ces traitements devraient toujours être effectués par le même technicien réalisant les prélèvements avec son propre matériel et son propre vermifuge (lutte contre les pseudorésistances). Un second examen est réalisé sur les animaux traités au moins douze jours après le traitement. Les résultats obtenus sont exprimés en nombre d'oeufs par gramme de fèces avant et après traitement, ceci permettant le calcul d'un pourcentage de réduction du taux de ponte. Si ce dernier est inférieur à 80%, la suspicion de résistance est envisageable. Dans ce cas la coproculture avant et après traitement peut aider à identifier la ou les espèces encore présentes et la ou les espèces ayant disparu.

Les avantages de ce type d'essai résident en plusieurs points :

- il est rapide
- il est peu coûteux car réalisé sur des lots d'environ dix animaux par classe d'âge par contre :
- il est trop imprécis pour permettre une conclusion
- il doit rester un essai de suspicion

Il est important de remarquer que le délai entre les deux coproscopies quantitatives [réalisées par la technique de Mac Master modifiée (voir annexe)], de 12 jours, est très important. En effet, il a été constaté une chute de la ponte des Nématodes (strongles digestifs) après traitement, que les strongles soient sensibles ou résistants (Kerboeuf *et al.*, 1990). La ponte reprend une semaine après le traitement. Si le délai entre deux traitements est trop court, l'efficacité du traitement peut être affirmée à tort. Par contre si le délai est trop long, une réinfestation des animaux, un réveil des larves en hypobiose, peuvent faire penser à une résistance.

Il faut compléter notre remarque en indiquant que l'estimation du pourcentage de réduction du taux de ponte est peu fiable dans le diagnostic de résistance car cette dernière peut varier notablement en fonction de nombreux facteurs :

- 1 - *L'alimentation* : Ainsi, un changement brutal d'alimentation peut provoquer une

diarrhée bénigne des animaux, une chute de la ponte des Nématodes, associée à une dilution des matières fécales. Certains auteurs utilisent donc des coefficients de correction des coproscopies quantitatives selon la consistance des fèces. De plus, les animaux de pâturage, voient augmenter la prolificité des femelles gravides des Nématodes, par l'intermédiaire de facteurs ocytociques végétaux (Dorchies *et al.*, 1990).

- 2 - *l'état immunitaire* : L'immunité antiparasitaire entraîne une inhibition sur la ponte des helminthes. Un changement alimentaire, un stress de l'animal, une maladie intercurrente entraînant une chute de l'immunité, donnent une élévation de la ponte des Nématodes. Chez les ovins et pour les strongles, l'immunité optimale est atteinte à l'âge de huit à dix mois. Les brebis hébergent des strongles plus petits et moins féconds (car issus d'infestations répétées) alors que les agneaux hébergent des vers plus prolifiques (car issus de primo-infestations).

- 3 - *état physiologique particulier à certaines espèces* : chez les ovins et les caprins, on observe une augmentation physiologique de la ponte des strongles après la parturition, nommée "post-parturiant egg rise".

- 4 - *les espèces de strongles* : une souche d' *H. contortus* sensible, par exemple, les femelles pondant plusieurs milliers d'oeufs par jour, peut masquer une souche d'*Ostertagia* résistante mais pondant peu. Cela explique l'intérêt d'effectuer des coprocultures pour identifier les genres présents dans l'élevage.

#### 4-2 - LES ESSAIS IN VITRO :

Ils sont employés en routine pour le dépistage des résistances. Le développement actuel s'oriente vers des essais rapides, reproductibles et peu coûteux (Beaumont-Schwartz *et al.*, 1987).

##### 4-2-1 - Essais utilisés en routine :

##### 4-2-1-1 - Essais de résistance au lévamisole, pyrantel, morantel :

##### 4-2-1-1-1 - Test de paralysie des larves infectantes :

Ces antihelminthiques possèdent un effet cholinergique, entraînant une paralysie spastique des Nématodes. Pour les strongles gastro-intestinaux, les larves de stade III sont obtenues par coproculture et récupérées par la méthode de Baermann. Elles sont mises en contact avec des dilutions croissantes d'antihelminthiques pendant 24 heures. Un dénombrement des larves paralysées (immobiles pendant plus de cinq secondes) est alors effectué. La dose paralysante 50% est calculée. Ce test reste d'une part très difficile à lire (distinction d'une larve immobile d'une larve paralysée) et d'autre part très subjectif (paralysie réversible).

##### 4-2-1-1-2 - Pouvoir paralysant du lévamisole :

Proposé par Dobson *et al.* en 1986 (*in* Beugnet, 1991), pour pallier la subjectivité du test de paralysie des larves infectantes par le lévamisole. Cet essai préconise de faire évoluer des oeufs d'helminthes jusqu'au stade d'éclosion en présence de concentrations progressives du produit à étudier, (15 ou 16 heures à 26°C), puis lorsque l'éclosion est achevée dans les tubes témoins (suspension des oeufs dans l'eau), la réaction est stoppée avec du formol. La proportion d'oeufs non éclos à chaque concentration est appréciée. Une des principales difficultés rencontrée ne réside pas dans la mise en place du test lui même, mais dans l'obtention de chlorhydrate de lévamisole sans additif toxique (préparations commerciales) pour les oeufs. De plus les oeufs doivent être, au début de l'essai, tous au même stade de développement (condition difficile à respecter, surtout avec un mélange d'espèce).

#### 4-2-1-2 - Tests d'inhibition d'éclosion des oeufs en présence de benzimidazoles :

Mis au point par Coles et Simpkin en 1977 (*in* Beugnet, 1991), modifié par de nombreux auteurs dont Beaumont-Schwartz *et al.* en 1987 pour le simplifier et l'adapter aux strongles des pays tempérés. Les benzimidazoles et leurs dérivés possèdent un réel pouvoir ovicide (inhibition de la fumarate réductase intervenant dans le métabolisme énergétique anaérobie de l'oeuf, inhibition de synthèse de tubuline intervenant dans l'embryogenèse). Ainsi les oeufs des souches résistantes à la famille des benzimidazoles peuvent éclore en présence d'une concentration relativement élevée de ces produits. La mise en place de ce test présente deux difficultés principales :

- 1 - *les oeufs de strongles* : ils doivent être au même stade au début du test, et, surtout, l'embryonnement ne doit pas être débuté. En effet, l'embryonnement des oeufs, en déclenchant un métabolisme aérobie, favorise l'insensibilité aux benzimidazoles (bloqueurs de la fumarate réductase). Pour cette raison, les prélèvements sont donc réalisés par recueil rectal des fèces, empêchant l'embryonnement des oeufs, puis la conservation a lieu dans un milieu pauvre en oxygène. La technique de conservation la plus simple, est le dépôt des fèces dans un récipient rempli d'eau bouillie dépourvue d'oxygène en suspension, puis hermétiquement clos. Ce type de prélèvement peut être conservé 24 heures à 4°C. Ce type de conservation affecte le taux d'éclosion mais les calculs prennent en compte le taux d'éclosion chez des témoins ayant subi les mêmes conditions de conservation. Cette technique de conservation a été évaluée pour *H. contortus* et *T. circumcincta* (Beugnet, 1991). Coles préconise une conservation des oeufs à 20°C sans réfrigérer, cette dernière entraînant une diminution du taux d'éclosion. D'autres essais montrent que le taux d'éclosion des témoins à 4°C est supérieur (Beugnet, 1991). Le *Central Veterinary Laboratory* de Weybridge (GB) a mis au point un kit de stockage anaérobie des échantillons de fèces de mouton et de chèvre, qui permet une conservation optimale de sept jours.

- 2 - *les benzimidazoles utilisés* : les formes galéniques utilisées sont celles du commerce et sont représentées par des suspensions. Mais une des caractéristiques de ce test est la nécessité de posséder une solution aqueuse d'antihelminthique et non une suspension. Le thiabendazole est peu soluble dans l'eau, cette solubilité est améliorée par l'addition d'acide chlorhydrique. Les autres benzimidazoles comme l'albendazole et l'oxibendazole sont

solubilisés par addition de diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration maximale finale de 0,125 % (inoffensive pour les oeufs).

4-2-1-2-1 - La technique : (décrite par Beugnet dans sa thèse de 1991)

Cet essai est toujours envisagé après l'essai de suspicion coproscopique. Il comporte trois étapes principales qui sont : l'extraction des oeufs, la mise en contact avec l'antihelminthique à étudier, le traitement statistique des données.

a) L'extraction des oeufs :

La quantité de fèces requise pour que le test soit applicable est de minimum 100 grammes. Il faut réaliser une coproculture en parallèle pour permettre le calcul des facteurs de résistance relative des espèces présentes.

- L'extraction débute par une mise en solution des fèces dans l'eau du robinet dans un récipient d'environ 500 ml.

- Premier tamisage à l'aide d'une passoire à thé ; il faut récupérer, environ, 2,5 litres de liquide dans un seau ; les gros débris restent sur la passoire.

- Second tamisage sur tamis de 100  $\mu\text{m}$  qui retient les débris, récupération dans un seau d'un litre en trois fois.

- Troisième tamisage sur tamis de 32  $\mu\text{m}$ , les oeufs de strongles dont la taille est d'environ 80  $\mu\text{m}$  par 45  $\mu\text{m}$  restent sur le tamis.

- Récupération de la surface du tamis dans un bécher (200ml), sédimentation au réfrigérateur pendant 15 minutes à 4°C.

- Enrichissement des solutions :

\* retrait du surnageant des béchers par une pompe à vide classique,

\* élimination des impuretés par une méthode de flottation avec du sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ) en solution comme liquide de flottation (densité de la solution = 1,1). Cette technique est suffisante pour éliminer les débris en conservant les oeufs dans un anneau proche de la surface, de plus, la solution dense de  $\text{MgSO}_4$  présente une moindre toxicité que la solution d'iodomercurate de potassium ( $d = 1,44$ ) et le  $\text{MgSO}_4$  à la densité de 1,28.

\* récupération de l'anneau ou plus facilement, de la totalité du surnageant des deux plots de centrifugation.

\* tamisages successifs pour éliminer le maximum de débris végétaux, il faut surtout laver abondamment les oeufs qui restent sur le tamis de 30  $\mu\text{m}$  pour éliminer le sulfate de magnésium qui pourrait être toxique si les oeufs restaient longtemps à son contact.

\* suspension finale : les oeufs restés sur le tamis de 30  $\mu\text{m}$  sont récupérés à l'aide d'une pissette d'eau désionisée ou distillée dans un tube à centrifuger. Il ne faut pas dépasser 5ml pour la quantité finale. Le dénombrement des oeufs se fait en étalant 50  $\mu\text{l}$  sur une lame, ce qui permet d'estimer la concentration de la suspension finale. Il faut alors réaliser une dilution pour obtenir une suspension d'oeufs de strongles à 100 oeufs/100  $\mu\text{l}$ , soit 1000 oeufs par ml. Il est essentiel lors de la mise en contact avec les benzimidazoles d'agiter la solution à chaque fois avant de mettre les 100  $\mu\text{l}$  dans le tube à hémolyse car les oeufs sédimentent rapidement (quelques secondes).

b) La mise en contact avec l'antihelminthique à étudier :

Des dilutions à partir des solutions commerciales du benzimidazole à étudier sont réalisées. La solubilisation du thiabendazole est facile en ajoutant sept gouttes d'acide chlorhydrique normal (1N) pour 100 ml. L'albendazole et l'oxibendazole sont solubilisés à l'aide de DMSO, s'accompagnant souvent d'une gélification du DMSO et de la formation d'un précipité blanchâtre, si l'on ne réalise pas le mélange progressivement et sous agitation constante. Une gamme de dilutions de 20 à 960 ng/ml. L'essai est réalisé en microméthode, en additionnant dans un tube à hémolyse, 100  $\mu\text{l}$  de suspension d'oeufs et 50  $\mu\text{l}$  de la solution d'antihelminthique de chaque concentration (trois tubes de chaque dilution). Les séries de tubes sont mises à incuber, dans une étuve, 48 heures à 20-22°C (si les strongles sont issus d'un climat tempéré ; si ces derniers sont issus d'un climat tropical, il faut incuber 24 heures à 27-28°C). Les pourcentages d'éclosion des témoins mis 48 heures à 20°C sont généralement supérieurs à 90%.

#### 4-2-1-2-2 - Lecture de l'essai et analyse des résultats :

La lecture des témoins se fait par la numération des oeufs morts, d'une part, des oeufs embryonnés et larves, d'autre part. Le pourcentage d'éclosion est ainsi calculé :

$$\text{nombre de larves} / (\text{nombre d'oeufs} + \text{nombre de larves}) \times 100$$

La moyenne des trois témoins est alors faite.

La lecture de chaque tube à hémolyse consiste à compter le nombre de larves écloses ( $L_1$  en 48 heures) et les oeufs (morts ou embryonnés). Le pourcentage d'éclosion est ensuite calculé puis pondéré par celui des cultures témoins.

La moyenne des trois tubes permet de remplir un tableau de données associant à chaque concentration d'antihelminthique ( $x$ ), le pourcentage d'éclosion pondéré ( $y$ ). La courbe ainsi obtenue  $y = f(x)$  est une courbe sigmoïde correspondant à la courbe cumulée de l'effet d'un facteur sur une population de répartition normale. L'expression de la concentration d'antihelminthique ( $\mu\text{g/ml}$ ) en logarithme et du taux d'éclosion en probit permet de transformer la sigmoïde en droite. En effet le couple de coordonnées ( $x, y$ ) où  $x$  désigne le  $\log(\text{concentration})$  et  $y$  le probit de l'éclosion est approximativement situé sur deux droites de régression dont le coefficient de corrélation est significativement différent de 0. En général  $r$  est compris entre 0,8 et 1. Dans tous les cas on vérifiera toujours si la corrélation est significative (coefficient de corrélation significativement différent de 0). Dans le cas contraire les données sont inexploitable .

Equation de la droite utilisée :

$$(y - m_y) = (\text{cov } xy / \text{var } x) \cdot (x - m_x)$$

$m_x$  et  $m_y$  : moyennes des valeurs obtenues des variables  $x$  et  $y$

$\text{var } x$  et  $\text{var } y$  : variances estimées des variables  $x$  et  $y$

$\text{cov } xy$  : covariance estimée des variables  $x$  et  $y$

La droite de régression est la droite d'équation ( $z = p + q$ ), permettant l'estimation de la valeur de la moyenne  $z$ , la variable continue  $z$  pour une valeur donnée de la variable.

L'intérêt de cette analyse statistique est de prévoir la  $DL_{50}$  d'antihelminthique correspondant à 50 % d'inhibition d'éclosion (50%  $\rightarrow y = 5$  probit). Après le calcul de la  $DL_{50}$ , il est possible de calculer le facteur de résistance. Lorsque le facteur de résistance est compris entre 1 et 5, les strongles sont considérés comme tolérants, si ce facteur est supérieur à 5 ceci indique que la souche nécessite une concentration d'antihelminthique *in vitro* au moins 5 fois supérieure à celle nécessitée par une souche sensible de même espèce et issue du même hôte.

#### 5-2-1-2-3 - Conclusion :

Cet essai est donc reproductible, sa durée totale de réalisation est d'environ une demi-journée pour trois prélèvements de fèces et pour une personne. Les cultures sont arrêtées au bout de 48 heures par addition d'une goutte de solution iodo-iodurée (iode sublimé 10 g, iodure de potassium 50 g, eau qsp 100 ml), colorant les larves en jaune orangé. Une congélation des tubes peut permettre une lecture différée et groupée. Cet essai représente le test de dépistage des résistances le plus employé actuellement.

Les essais *in vitro* très pratiqués possèdent néanmoins un inconvénient majeur : ils détectent une résistance sur les stades libres des parasites mais ne prennent pas en compte le métabolisme des antihelminthiques chez l'hôte. Des essais actuellement en cours d'évaluation devraient permettre de dépister des résistances à tous les antihelminthiques et de généraliser ces études aux stades parasites des *Trichostrongylidae* :  $L_4$ , stade 5 et adultes.

#### 4-2-2 - Perspective des essais *in vitro* :

##### 4-2-2-1 - Test d'inhibition du développement larvaire :

Cet essai permet le suivi de l'évolution d'un nombre fixé de larves de premier âge écloses, issues de cultures standardisées, jusqu'au stade larvaire  $L_3$ , en présence de dilutions croissantes d'antihelminthiques (en suivant le principe général du test d'inhibition d'éclosion avec les benzimidazoles). Cette technique est relativement longue (10 jours), car elle nécessite le temps d'évolution des  $L_1$  en  $L_3$ , mais est applicable à tous les antihelminthiques. Une des difficultés réside dans le choix du milieu de culture standard optimal des  $L_1$  en  $L_3$ , évitant la perte d'un trop grand nombre de larves. Le milieu de culture actuellement préconisé est un mélange d'une solution saline "Earle" avec un lyophilisat d' *E. coli* et de

levures en guise de nutriment larvaire (Coles *et al.*, 1989 ; Taylor *et al.*, 1990 ; *in* Beugnet, 1991).

#### 4-2-2-2 - Test de résistance des stades parasites :

Le développement de ce type d'essai, implique la mise au point de cultures des stades préimaginaux des parasites (L<sub>4</sub>, stade 5), afin d'obtenir un test *in vitro* plus proche de la réalité *in vivo*. La culture de stades préimaginaux (stade 5) chez *H. contortus* à été décrite en 1974 par Gevrey *et al.* (*in* Beugnet, 1991). Bien que plus proche d'une certaine réalité cette technique ne prend pas en compte la métabolisation du produit par l'animal ; ce défaut pourrait être corrigé par l'utilisation de sérum d'animaux traités, ou, pour plus de précisions, d'extraits de métabolites sanguins.

#### 4-3 - Les méthodes biochimiques :

Elles permettent l'étude du mode d'action et des phénomènes de résistance au niveau des sites d'action des composés antihelminthiques.

##### 4-3-1 - Essais de liaison des benzimidazoles à la tubuline :

Les benzimidazoles bloquant la polymérisation de la tubuline en microtubule, des tests de liaison ont été mis au point par Lacey *et al.*, en 1986 sur *H. contortus* et par Sangster *et al.*, en 1985 sur *T. colubriformis* (*in* Lacey, 1988). Ces tests permettent d'observer que la fixation des benzimidazoles n'a pas lieu ou est beaucoup plus faible chez les souches résistantes.

## Méthodologie pour l'investigation de l'activité inhibitrice sur les microtubules :

L'investigation des inhibiteurs des microtubules utilise diverses techniques biochimiques pour identifier l'activité et le site d'action :

### - 1 - Isolement de la tubuline :

Les stratégies pour l'isolement de la tubuline impliquent trois caractéristiques :

- \*\* des cycles de polymérisation/dépolymérisation dépendants de la température.
- \*\* une interaction avec un ligand basique
- \*\* une affinité du ligand spécifique

En général, l'utilisation du cycle de température est limitée aux sources riches en tubuline (comme le cerveau) où la concentration critique de tubuline est obtenue dans le surnageant brut ou peut être obtenue par concentration de la protéine. De nombreuses permutations des conditions de la solution d'extraction ont été ajoutées depuis la première publication par Shelanski *et al.*, en 1973, comme l'utilisation du glutamate (Hamel *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988), du DMSO (Himes *et al.*, 1977 ; *in* Lacey, 1988), du taxol (Collins *et al.*, 1987 ; *in* Lacey, 1988).

L'utilisation de la chromatographie par échanges d'ions avec un ligand basique est la technique la plus développée. La tubuline est absorbée sur une colonne de gel de DEAE [diéthylaminoéthyle :  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ , échangeurs d'anions] et éluée par un gradient linéaire ou en palier de tampon de force ionique élevée. La tubuline est éluée à 0,5-0,8 M de NaCl ou KCl. Lacey *et al.*, en 1988, montrent qu'en utilisant un aminoligand moins hydrophobe comme la polylysine, un aminoéthyle, la lysine ou l'arginine, la tubuline est purifiée sans exposition à des concentrations élevées en sels, ces derniers induisant une dénaturation partielle de la tubuline (Croom *et al.*, 1986 ; *in* Lacey, 1988).

L'isolation de la tubuline par affinité du ligand est basée sur la spécificité de l'interaction de la tubuline avec toute une variété de composés de bas poids moléculaire. Par exemple, les gels d'affinité à la colchicine (Hinman *et al.*, 1973 ; *in* Lacey, 1988), la précipitation à la vinblastine (Bryan, 1971 ; *in* Lacey, 1988) et des protéines comme la lactopéroxydase (Rousset et Wolff, 1980 ; *in* Lacey, 1988), les anticorps à la tubuline (Ikeda et Steiner, 1976 ; *in* Lacey, 1988) et la tubuline elle-même (Lockwood, 1978 ; *in* Lacey, 1988). Kocha *et al.*, en 1986 montrent que les colonnes d'affinité à la colchicine semblent

représenter la combinaison d'une affinité spécifique et d'interactions hydrophobes non spécifiques, puisque la colchicine peut être remplacée par divers autres ligands hydrophobes avec un degré de purification similaire.

D'autres ajouts à ces méthodes pour effectuer une purification initiale ou finale, comprennent une précipitation par  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , une chromatographie sur phosphocellulose et une précipitation par le  $\text{Mg}^{2+}$ .

Plusieurs limitations sur les méthodes citées plus haut peuvent être notées. En utilisant le cycle de température, la polymérisation et l'isolement de la tubuline peuvent être effectués en présence d'une quantité variable de MAPs (6 à 20%) ; cependant, seule la tubuline au-dessus de la concentration critique est enlevée à chaque cycle tandis que de fortes pertes en microtubules stables à froid, sont enregistrées pendant la dépolymérisation sur la glace (Margolis et Rouch, 1981 ; *in* Lacey, 1988). L'utilisation de la chromatographie sur DEAE produit essentiellement une tubuline pure mais implique l'utilisation du DMSO pour des études de polymérisation ultérieures. De plus, les concentrations en sels requises pour éluer la tubuline, altèrent toute étude sur la stoechiométrie du ligand tritié. Les principales limitations des techniques de ligand spécifique sont liées à l'échec de leur application aux différentes sources de tubuline (Farrell, 1982 ; *in* Lacey, 1988).

L'isolement de la tubuline de sources non-nerveuses et surtout de sources n'impliquant pas des mammifères, où la tubuline représente moins de 1% des protéines totales solubles (contre 20% dans le cerveau), rencontre beaucoup de difficultés. En 1982, Morejohn et Fasket (*in* Lacey, 1988), proposent un protocole en deux étapes pour l'isolement de tubuline végétale, avec, premièrement, l'utilisation de DEAE-Séphadex A50 et deuxièmement, une précipitation avec du sulfate d'ammonium.

Pour les helminthes parasites, Watts, en 1980 (*in* Lacey, 1988), propose une purification partielle de la tubuline de *H. diminuta* sur cellulose DE-52. Une technique alternative sur colonne avec DEAE-Séphadex a été utilisée pour la purification partielle de la tubuline d'*A. galli* (Ireland *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988), méthode similaire à celle employée pour le champignon *A. nidulans* par Davidse *et al.*, en 1977. Cette étape fut incorporée dans le processus en trois étapes de purification totale de la tubuline d'*A. galli* proposé par Dawson et Flach, en 1983. Dans ce protocole, la tubuline, était éluee du Séphadex-DEAE par une solution saline (0,4 M), puis concentrée par ultrafiltration, centrifugée pour éliminer les filaments d'actine et polymérisée en utilisant du DMSO.

Cette purification complète était atteinte par un cycle température-dépendant avec une étape de polymérisation assistée par le DMSO. Ce protocole fut ensuite généralisé puisque des purifications sur *A. suum*, *F. hepatica*, et *C. elegans* furent possibles. Cependant cette stratégie n'est pas sans limitations puisqu'elle combine à la fois les désavantages de la polymérisation et des techniques DEAE avec une dénaturation induite par le DMSO (Lacey *et al.*, 1986 ; *in* Lacey, 1988).

Gill et Lacey en 1988 proposent la combinaison de ligands acides aminés polaires (arginine et polylysine) avec une chromatographie sur hydroxyapatite. La combinaison des colonnes arginine et hydroxyapatite, permettent l'obtention de plus de 90% de pureté de la tubuline de *F. hepatica* et *M. expansa*. Pour les Nématodes, la récupération de la petite tubuline par 2,5% de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  sur des colonnes d'arginine est possible et l'arginine est alors substituée par une polylysine. La tubuline isolée d'adultes de *D. immitis*, *O. circumcincta*, *T. colubriformis* et *H. contortus*, par ce procédé contient des impuretés aux poids moléculaires de 63000 et 85000 qui peuvent être éliminées en changeant les conditions initiales du tampon (utilisation de tampons de force ionique élevée pour préparer le surnageant brut). L'isolement par cette technique demande moins de 5 heures avec une récupération de plus de 85% de la tubuline totale sans exposition à des conditions de dénaturation, et utilisable avec moins de 10mg de surnageant.

#### - 2 - Polymérisation/dépolymérisation :

La tubuline, *in vitro*, en présence de GTP, de  $\text{Mg}^{2+}$ , et de chélateur du calcium, à un pH de 6,4-7, subit une polymérisation pour former des microtubules après chauffage à 37°C. Dépendante de la méthode d'isolement (présence ou absence de MAPs), la polymérisation peut être exécutée dans un tampon typique à la tubuline (0,025-0,1M, MES, PIPES ou  $\text{PO}_4^{2-}$ ) ou induite par le glycérol, le DMSO, Le glutamate 1M, ou le taxol. La dépolymérisation est évaluée par refroidissement à 4°C. Les drogues inhibitrices sont ajoutées soit dans le tampon, soit dans le DMSO (concentration maximale de 1%) si l'induction au DMSO est utilisée. La transition est suivie par spectrophotométrie. En chauffant, un retard de 2 à 3 minutes est suivi par une croissance linéaire de l'absorbance (turbidité) avec un plateau atteint en 15 minutes. L'élévation des concentrations augmente progressivement le temps de latence et réduit à la fois le taux de changement de turbidité et la hauteur des plateaux. La courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la vitesse ou

du degré de polymérisation en fonction de la concentration de l'inhibiteur permet l'interpolation de la valeur de l' $I_{50}$  (concentration d'inhibiteur requise pour inhiber la vitesse ou le degré de polymérisation de 50%). Les tracés concentration-réponse sont généralement linéaires entre 10 et 85% d'inhibition. Au-dessus de 85% d'inhibition, les changements de la turbidité sont dus à une agrégation indépendante de la concentration de l'inhibiteur.

La polymérisation est très sensible à tous les inhibiteurs des microtubules puisque l'inhibition a seulement besoin d'une petite proportion de tubuline pour se lier (substoechiométrie), cependant on ne peut distinguer l'étroitesse de cette liaison. Cette technique est pratique pour déterminer quelles modifications structurales possèdent un effet favorable ou non sur l'activité, mais elle reste faiblement applicable pour différencier la puissance de l'inhibiteur, puisque pour atteindre la concentration de drogue requise pour l'inhibition, il faut grouper ces composés dans une fourchette de  $I_{50}$  de valeurs allant de 0,5 à 5  $\mu\text{M}$ . Les techniques de spectrophotométrie et de détection de la viscosité demandent une relativement grande quantité de tubuline (0,5 à 1,5 mg par échantillon), ce qui les restreint à la tubuline cérébrale. Pour les études où une quantité limitée de tubuline est disponible (tubuline parasitaire), le test de centrifugation des protéines est préféré (Dawson *et al.*, 1984 ; *in* Lacey, 1988).

### - 3 - Liaison d'un ligand : (Tableau No. 3)

Plusieurs méthodes de liaison d'un ligand tritié sur la tubuline brute ou purifiée ont été décrites. C'est l'extraction sur charbon de l'isotope non-lié qui est la plus pratique ; cependant elle est limitée à la colchicine tritiée chez les hauts eukaryotes et aux benzimidazoles tritiés chez les helminthes, les champignons et d'autres bas eukaryotes. Pour les autres ligands, le traitement au charbon détruit soit partiellement (podophyllotoxines tritiées), soit totalement (vinblastine tritiée) la liaison du ligand tritié à la tubuline (Cortese *et al.*, 1977 ; Lacey *et al.*, 1987 ; *in* Lacey, 1988). La désorption de la liaison du ligand durant la séparation lié/libre est reportée avec d'autres techniques et est dépendante de la puissance du ligand en tant qu'inhibiteur des microtubules. Des techniques non radioactives sont aussi disponibles comme l'augmentation de la fluorescence et la spectrophotométrie. Les techniques de liaison de ligands demandent de petites quantités de tubuline (0,5 à 50  $\mu\text{g}$ ) ; elles restent dépendantes de la pureté de la tubuline et sont hautement reproductibles.

**Tableau No. 3 - COMPILATION DES TECHNIQUES DE LIAISON DE LIGANDS**  
(D'après Lacey, 1988)

Technique	Ligand	Commentaires	Référence
filtration sur gel - colonne (standard) - colonne (Hummel <i>et al.</i> ) - mini-colonne (Penefsky)  - bande (Hirose <i>et al.</i> )	CLC	Largement utilisée dans les études initiales	Wilson, 1970
	NDZ, GTP	Peu utilisée	Head <i>et al.</i> , 1985
	GTP, VBL	Utilisée pour les interactions BZ-tubuline cérébrale	Zeeberg <i>et al.</i> , 1979
	NDZ	Utilisée dans de larges applications	Head <i>et al.</i> , 1985
Papier DEAE	Nombreux ligands	Applicable à toutes les interactions de ligands	Borisy, 1972
Absorption sur charbon	CLC, BZCs chez les bas eukaryotes	Simple, largement reproductible	Sherline <i>et al.</i> , 1974 Lacey <i>et al.</i> , 1986
Fluorescence	CLC et autres colchinoïdes	Limitée aux tropolones ligands du site de la colchicine	Ray <i>et al.</i> , 1981 Bane <i>et al.</i> , 1984
	Bis ANS	L'émission décroît à 335nm, augmente à 490nm	Prasad <i>et al.</i> , 1986
	DAPI	-	Bonne <i>et al.</i> , 1985
Dichroïsme circulaire	CLC	Spécifique aux analogue de la CLC	Detrich <i>et al.</i> , 1981 Yeh <i>et al.</i> , 1988
Dialyse	MBZ	Peu utilisée	Laclette <i>et al.</i> , 1980

Abréviations utilisées : CLC = Colchicine ; NDZ = Nocodazole ; VBL = Vinblastine ; BZCs = Carbamates de Benzimidazole ; MBZ = Mébendazole

#### - 4 - *Activité de la GTPase :*

Dans le glutamate molaire, la polymérisation de la tubuline est couplée avec une hydrolyse du GTP tritié. En présence d'inhibiteurs des microtubules le niveau de l'hydrolyse en GDP tritié est altéré (Lin et Hamel, 1981 ; *in* Lacey, 1988). Depuis tous les inhibiteurs étudiés sont influents sur l'activité de la GTPase par, soit en l'augmentant (colchicine, nocodazole), soit en l'inhibant (vinblastine, maytansine et podophyllotoxines).

#### - 5 - *Alkylation :*

Les inhibiteurs des microtubules inhibent l'alkylation de la tubuline par l'iodoacétamide  $^{14}\text{C}$  (Roach, 1985 ; *in* Lacey, 1988). La capacité de protection du groupement -SH est caractéristique de plusieurs inhibiteurs, mais pas structurellement liée aux non-inhibiteurs. Cette technique n'est utilisée que pour un nombre réduit de composés et manque de généralisation.

#### - 6 - *Les isoformes aberrantes bis-alkylées :*

Lorsque la tubuline est alkylée avec le N,N'-éthylène bis-iodoacétamide, la formation d'une  $\beta$ -isotubuline anormale,  $\beta^*$ , dérivant d'une liaison croisée entre des groupements -SH spatialement proches est observée. En présence de colchicine ou d'autres composés qui inhibent la liaison de la colchicine tritiée, la formation de la tubuline  $\beta^*$  est inhibée tandis qu'elle est augmentée par les ligands du site de la vinblastine (Roach et Luduena, 1984 ; *in* Lacey, 1988). Lorsque l'alkylation est entreprise en l'absence de GTP, une seconde liaison croisée est formée avec une différence dans la mobilité électrophorétique de cette tubuline  $\beta$ ,  $\beta^s$ . La formation de cette tubuline  $\beta^s$  est inhibée en présence de vinblastine et des ligands du site de la vinblastine, tandis que les analogues du site de la colchicine l'augmente (Little et Luduena, 1985 ; *in* Lacey, 1988).

#### - 7 - *Toxicité sur la croissance :*

Les inhibiteurs des microtubules bloquent la division cellulaire des cultures *in vitro* (Dustin *et al.*, 1984 ; *in* Lacey, 1988). En soi, l'inhibition de la croissance d'un organisme n'est pas spécifique des inhibiteurs microtubulaires, mais la détermination du profil dose-réponse pour déterminer la  $\text{DE}_{50}$  et la  $\text{DL}_{50}$  est un aspect important dans les études sur la structure-activité et la résistance. En conjonction avec les techniques connues pour être

dépendantes des microtubules, par exemple, l'index de mitoses, les changements morphologiques spécifiques, et l'immunofluorescence de la matrice microtubulaire, une tentative d'identification des mécanismes dépendants de la tubuline peut être faite.

#### 4-3-2 - Dosage quantitatif des activités enzymatiques :

Les Nématodes, confrontés au suc digestif de l'hôte, doivent résister à de fortes concentrations d'acétylcholine, provoquant une augmentation de la motilité et des sécrétions du tube digestif de l'hôte. L'acétylcholine stimule également la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Yeates et Ogilvie, 1976), et pourrait être directement toxique pour le Nématode. Ce dernier produit donc diverses substances à forte activité acétylcholinestérasique (estérases non spécifiques + une acétylcholinestérase) (Rapson *et al.*, 1986). Rapson a montré que plusieurs antihelminthiques (benzimidazole, lévamisole, ivermectine) diminuent la sécrétion d'acétylcholinestérase par les strongles sensibles (*N. brasiliensis*).

Des études sur l'activité acétylcholinestérasique totale (sécrétée et interne), effectuées sur broyats de larves infestantes d'*H. contortus* montrent une concentration d'acétylcholinestérase supérieure chez les souches résistantes par rapport aux souches sensibles (Sutherland *et al.*, 1988 ; *in* Beugnet, 1991). Ces observations montrent la possibilité d'utilisation de l'acétylcholinestérase comme source de différenciation des souches résistantes et des sensibles. Sutherland *et al.*, en 1990 (*in* Beugnet, 1991), ont mis au point un test colorimétrique rapide et simple à mettre en oeuvre.

Un autre essai, utilisant les propriétés acétylcholinestérasiques du Nématodes, consiste à observer la paralysie des larves (d'*H. contortus*, de *T. circumcincta* et de *T. colubriformis*) mises en contact avec des dilutions d'ésérine (physostigmine), qui, à dilution égale, paralyse plus facilement une souche possédant peu d'acétylcholinestérase (donc sensible) (Sutherland *et al.*, 1988, 1989 ; *in* Beugnet, 1991). Ce test est similaire au test de paralysie des larves infectantes en présence de lévamisole et pose les mêmes problèmes de lecture. Ces techniques de détection d'activité enzymatique reposent essentiellement sur des variations enzymatiques quantitatives et non qualitatives entre souches sensibles et résistantes.

#### 4-3-3 - Comparaison des isoenzymes :

Ces tests reposent, ici, sur une différence qualitative entre souches sensibles et résistantes aux dérivés des benzimidazoles. L'étude de Bekkaoui, en 1988 (*in* Beugnet, 1991), réalise une migration électrophorétique des protéines de Nématode (*H. contortus*) en gel de polyacrilamide, ces dernières se séparent selon leur charge électrique et migrant selon leur densité de charge (rapport entre la charge électrique et le poids moléculaire).

Après migration, les activités enzymatiques sont révélées par incubation des gels dans un milieu réactif contenant le substrat de l'enzyme ainsi que les réactifs nécessaires à la coloration du produit de la réaction. Cette étude ne montre aucune variation d'isoenzymes entre les souches résistantes et sensibles pour la malate deshydrogénase, l'acétylcholinestérase, la glycérophosphate deshydrogénase et les peroxydases. Mais il faut surtout comparer les isoenzymes d'un même sexe car des différences significatives existent entre nématodes mâle et femelle. D'autres études confirment une variation significative entre des protéines liées au site d'action des benzimidazoles sur les tubulines (Lacey *et al.*, 1986; *in* Beugnet, 1991).

#### 4-3-4 - Méthodes génétiques :

Les techniques de la biologie moléculaire permettent la réalisation de sondes ADN-spécifiques de gènes codant pour des protéines cibles des antihelminthiques comme la tubuline (Lacey *et al.*, 1990, Roos *et al.*, 1990). Le séquençage de tels gènes a mis en évidence des variations de la séquence du gène codant pour la  $\beta$ -tubuline entre souches sensibles et résistantes (Roos *et al.*, 1990). Ces dernières découvertes peuvent permettre l'application de techniques de biologie moléculaire à des tests de détection de résistance.

*Chapitre cinquième*

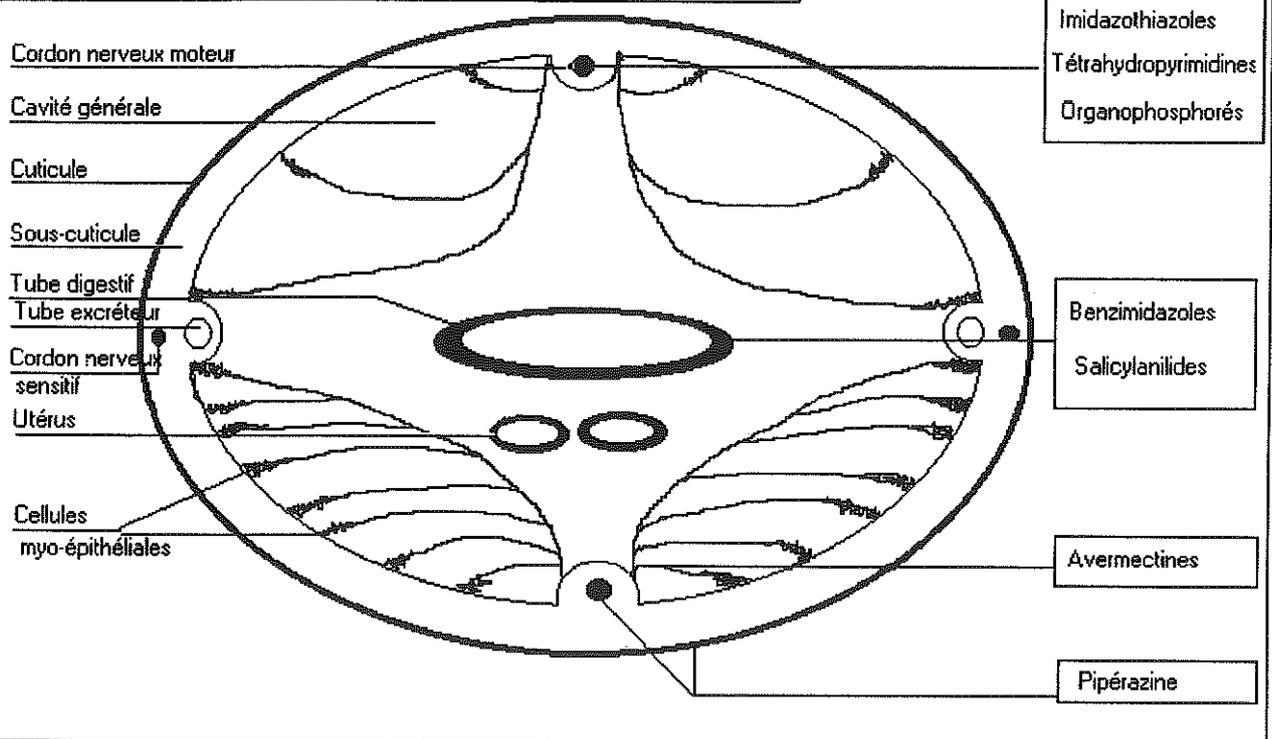
**RESISTANCE ET MODE D'ACTION DES ANTIHELMINTHIQUES**

Dans ce chapitre nous détaillerons le mode d'action des principales familles nématocides, en utilisant une classification prenant en compte le site de l'action la plus fondamentale de chaque antihelminthique. Dans chaque sous-chapitre nous insérerons les caractéristiques chimiques, pharmacocinétiques et pharmacologiques de ces composés afin de mieux comprendre les mécanismes intimes de la résistance.

#### 5-1 - SITES D'ACTION DES ANTIHELMINTHIQUES :

La figure No. 2 montre, d'après Lefebvre, en 1981 (*in* Beugnet, 1991), les sites d'action de certains antihelminthiques. Ces différents sites d'action entraînant un mode d'action spécifique à chaque antihelminthique, vont nous fournir le plan de ce cinquième chapitre. L'exemple le plus démonstratif d'étude de ces sites d'action, est l'article de Borgers et De Nollin, en 1975, montrant les changements ultra-structuraux de l'intestin d'*Ascaris in vivo* après un traitement au mébendazole. Ces changements sont représentés par l'absence de granules de sécrétion dans le tissu terminal, l'accumulation de granules de sécrétion dans la région du Golgi, la formation de vacuoles autophages dans la partie apicale de la cellule et une perte des réserves en glycogène après 6-9h de traitement. Les signes de dégénérescence sont très prononcés après 15h de traitement et envahissent l'intégralité du cytoplasme. Le nombre des microvillosités est abaissé et elles semblent gonflées dans une majorité de cellules intestinales. L'activité phosphatase acide de ces microvillosités est abaissée ou complètement absente.

**Figure No. 2 - Sites d'action de certains antihelminthiques sur coupe transversale de Nématode.**  
 Modifié d'après Lefebvre, 1981.



## **5-2 - MODE D'ACTION DES ANTIHELMINTHIQUES ET MECANISMES DES RESISTANCES :**

Selon Behm *et al.*, 1985, quatre principaux mécanismes d'action semble être justifiables :

- Les molécules agissant sur la neurophysiologie des helminthes
- Les molécules découplant la phosphorylation oxydative
- Les molécules interférant avec le métabolisme énergétique des helminthes
- Les molécules affectant l'intégrité cellulaire des parasites

### **5-2-1 - Composés agissant sur la neurophysiologie des helminthes :**

Ils se caractérisent par une interférence sur les synapses interneuronales ou neuromusculaires des Nématodes, avec un atteinte prépondérante des cordons nerveux moteurs et des cellules du tube digestif.

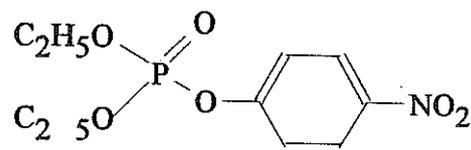
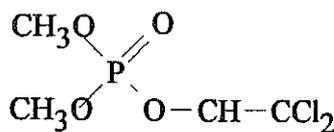
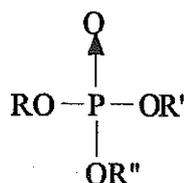
#### **5-2-1-1 - Les anticholinestérasiques :**

La famille chimique la plus caractéristique de ce type d'action est représentée par les organophosphorés (figure No. 3), qui, en se liant à la cholinestérase, inhibent la dégradation de l'acétylcholine en acétate et choline. Le pool d'acétylcholine de l'espace synaptique est ainsi exagérément augmenté et provoque, par l'intermédiaire des récepteurs postsynaptiques, une paralysie spastique du Nématode. Ce dernier, ne pouvant plus assurer sa fonction de fixation sur la muqueuse gastrique, se trouve expulsé. La sensibilité de la cholinestérase est variable selon l'organophosphoré et les espèces d'helminthes.

# Figure No. 3 - CLASSIFICATION DES ORGANOPHOSPHORES

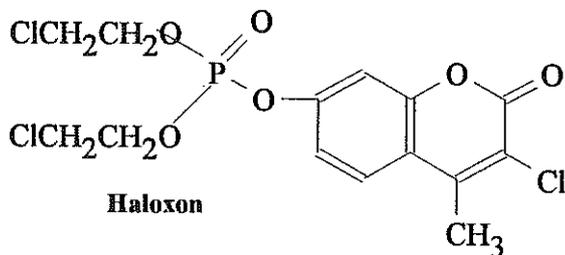
(d'après Moukrim, 1987)

## A) Phosphates :

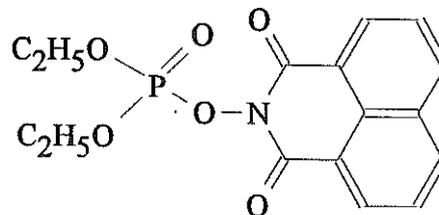


Paraoxon

Dichlorvos

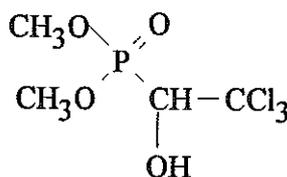
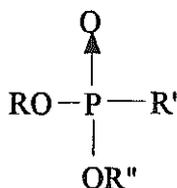


Haloxon



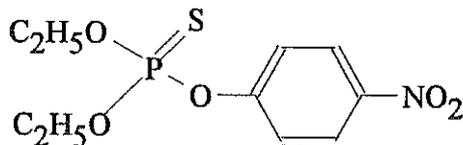
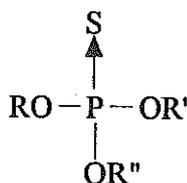
Naftalofos

## B) Phosphonates :

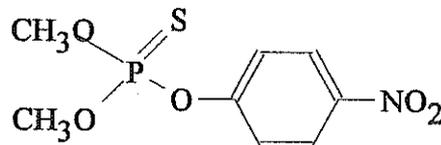


Trichlorfon

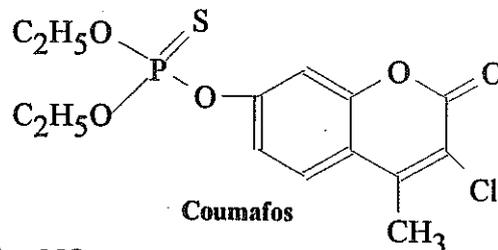
## C) Thiono-phosphates :



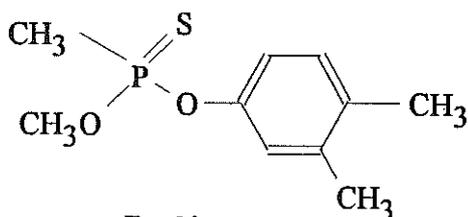
Parathion



Méthyl-parathion

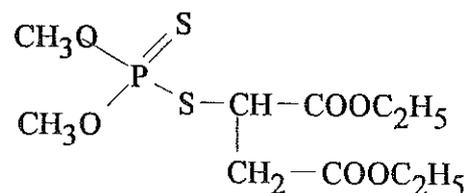
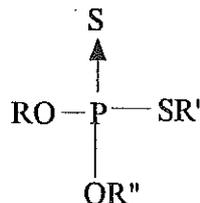


Coumafos



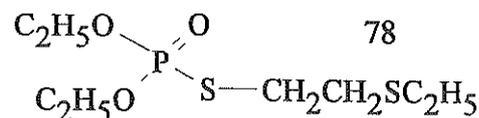
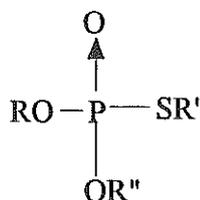
Fenthion

## D) Dithio-phosphates :



Malathion

## E) Thiolo-phosphates :



78

Déméton

#### 5-2-1-1-1 - Rappels sur la transmission synaptique et les cholinestérases :

Les cholinestérases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse alcaline de certains esters carboxyliques, notamment l'acétylcholine. On appelle acétylcholinestérase, l'enzyme hydrolysant préférentiellement l'acétylcholine, et butyrylestérase, l'enzyme hydrolysant préférentiellement la butyrylcholine.

#### **\*\* Rôle de l'acétylcholine :**

L'acétylcholine est un neuromédiateur de la transmission de l'influx nerveux chez de nombreux organismes ; elle agit au niveau des terminaisons axonales de la jonction neuromusculaire. Le mécanisme est le suivant :

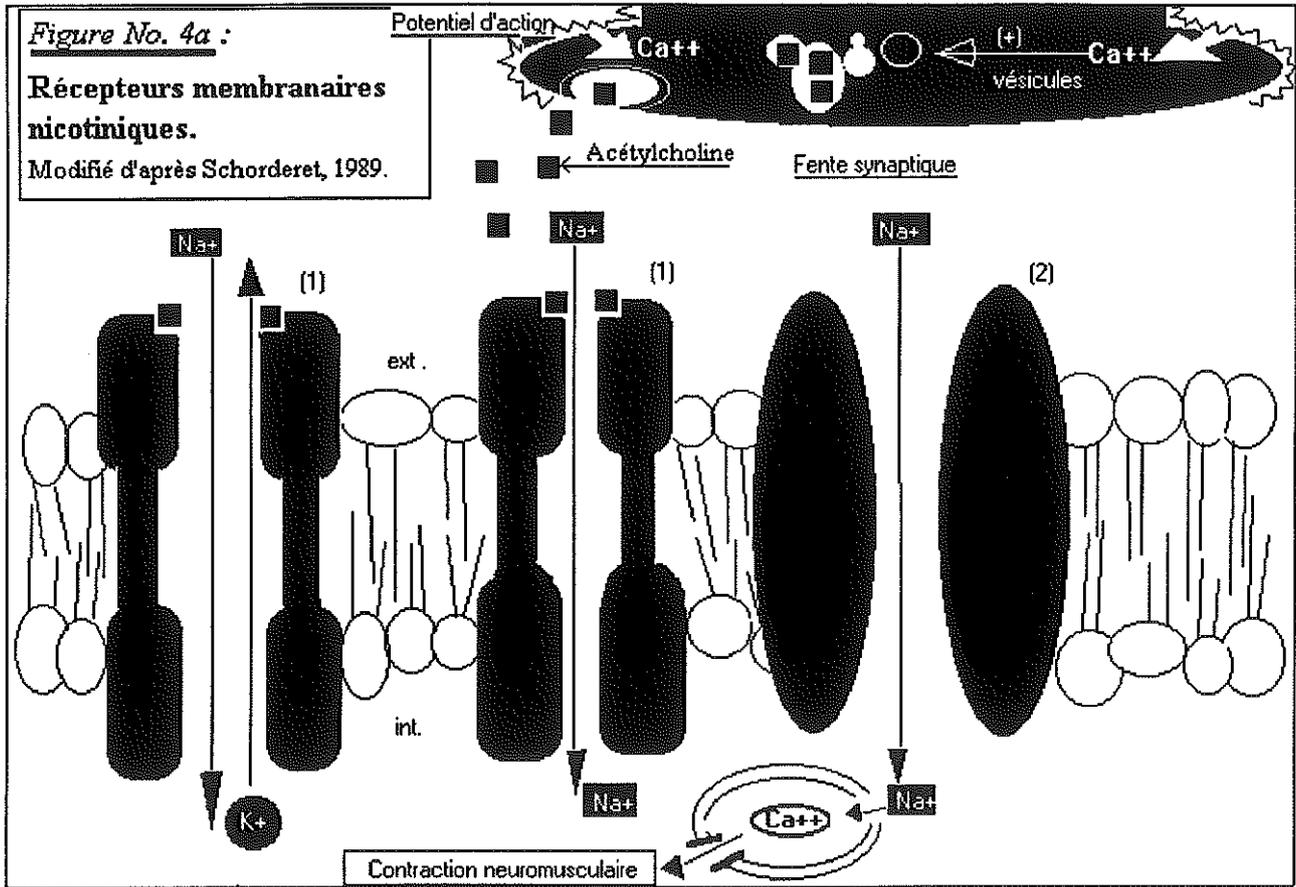
- L'acétylcholine se trouve dans les vésicules pré-synaptiques ou sous forme libre dans le cytoplasme.

- L'arrivée de l'influx nerveux au niveau des terminaisons pré-synaptiques induit l'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (présent dans la fente synaptique en concentration environ mille fois supérieure à l'extérieur) dans la cellule, provoquant une sortie de cette dernière à travers la membrane pré-synaptique (figure No. 4<sub>a</sub>).

Figure No. 4a :

Récepteurs membranaires  
nicotiniques.

Modifié d'après Schorderet, 1989.



- L'acétylcholine se fixe sur les récepteurs nicotiniques (fixation sur les deux sous-unités  $\alpha$ ) situés sur la membrane post-synaptique. Ces récepteurs semblent couplés à un canal ionique. Ils se composent d'une couronne formée de quatre structures protéiques flexibles et différentes,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ; seules les deux plus petites sous-unités,  $\alpha$ , de poids moléculaire 40000 daltons possèdent des sites primaires de reconnaissance de l'acétylcholine. La fixation du neuromédiateur entraîne l'ouverture de ces canaux avec entrée des ions  $\text{Na}^+$  et sortie des ions  $\text{K}^+$ , provoquant l'apparition d'un micropotential post synaptique. Ce récepteur peut se trouver au moins sous quatre conformations :

- \* conformation fermée (a), stabilisée par certains antagonistes de l'acétylcholine (état inactif). Le curare représente un de ces antagonistes.

- \* conformation ouverte (b), stabilisée par l'acétylcholine, avec entrée d'ions  $\text{Na}^+$  et sortie d'ions  $\text{K}^+$  (état actif).

- \* conformation désensibilisée (c), résultant d'une stimulation prolongée par l'acétylcholine. L'accès à cet état est rapide.

- \* conformation désensibilisée, stabilisée par l'acétylcholine et accessible par voie lente.

\* L'acétylcholine est ensuite dégradée et le récepteur revient à l'état inactif. L'ATPase  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -dépendante, rétablit les concentrations ioniques de départ en permettant la sortie de  $\text{Na}^+$ , et l'entrée de  $\text{K}^+$  (figure No. 4<sub>c</sub>).

- L'entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , dans les vésicules synaptiques permet la sortie de l'acétylcholine vésiculaire dans le cytoplasme des terminaisons pré-synaptiques.

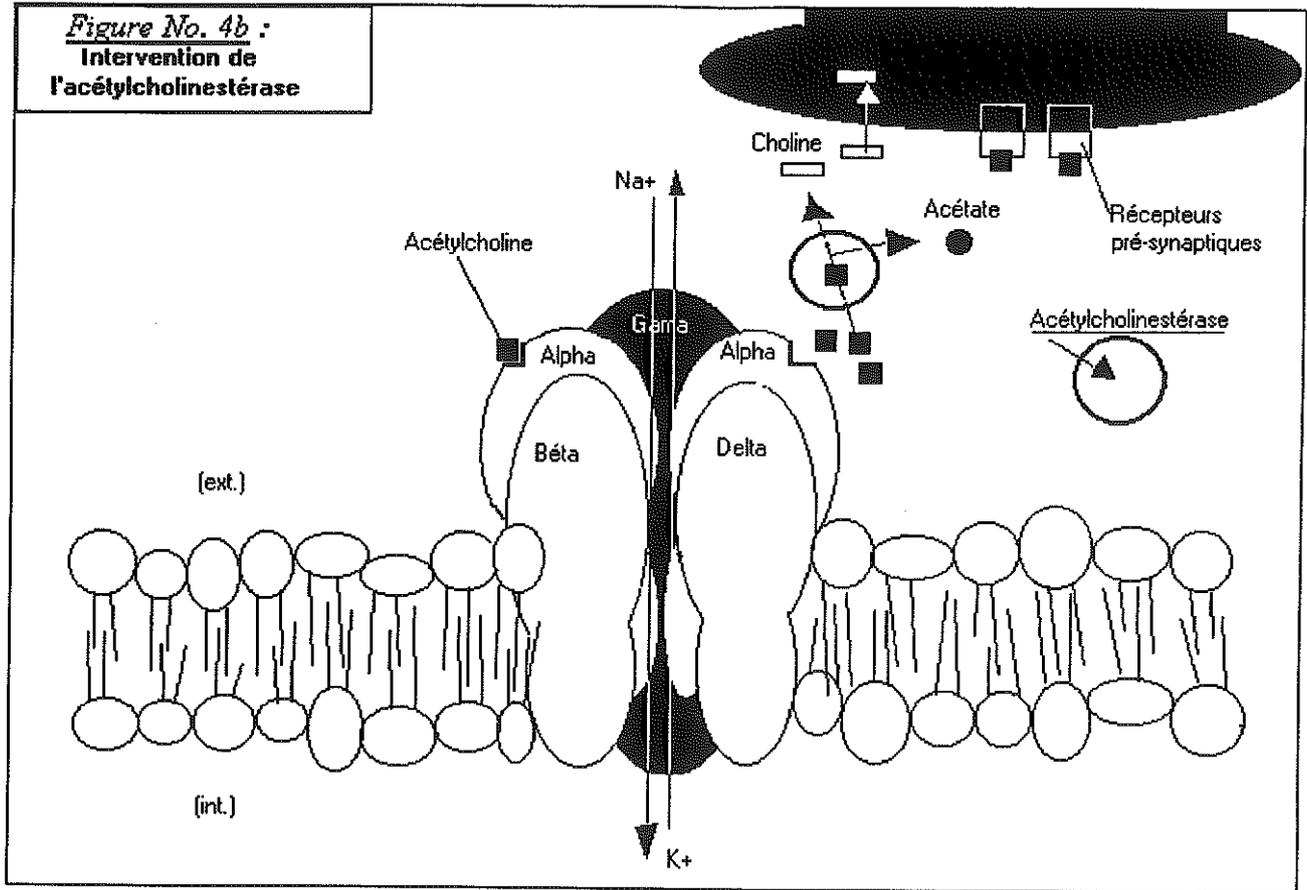
- L'acétylcholine peut aussi se fixer sur des neurones pré-synaptiques au niveau de récepteurs muscariniques et ainsi bloquer sa propre libération.

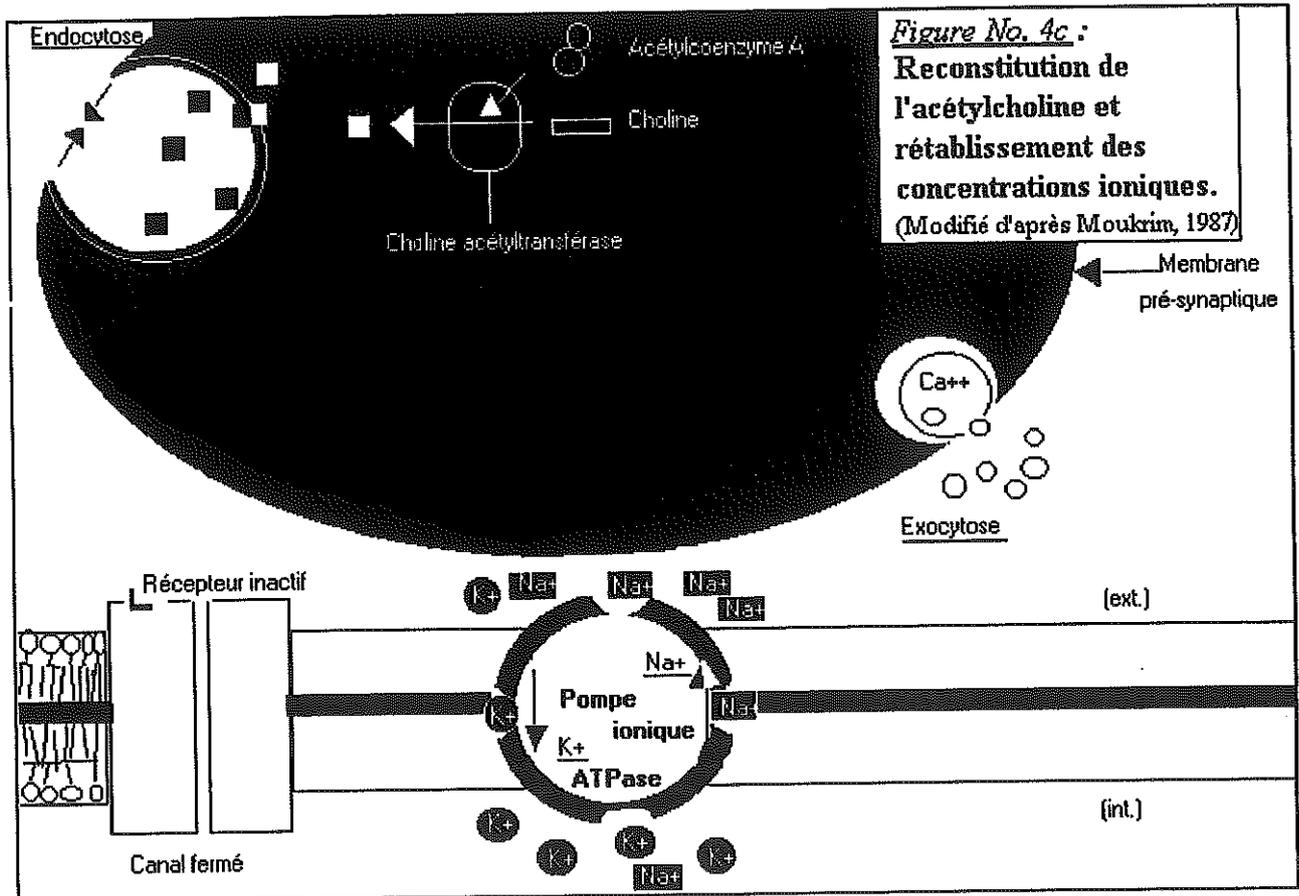
- L'hydrolyse de l'acétylcholine est effectuée par l'acétylcholinestérase située dans la fente synaptique (figure No. 4<sub>b</sub>). La choline formée est ensuite absorbée par le neurone pré-synaptique grâce à des transporteurs membranaires.

- En présence d'une choline acétyltransférase, la choline se combine avec l'acétylcoenzyme A pour redonner l'acétylcholine qui pénètre dans les vésicules formées par endocytose (figure No. 4<sub>c</sub>).

- les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont rejetés dans le milieu extérieur par exocytose (sortie peut être assurée par une pompe ATPase).

*Figure No. 4b :*  
**Intervention de l'acétylcholinestérase**





## **\*\* Hydrolyse de l'acétylcholine :**

L'acétylcholinestérase existe sous une forme globulaire (4 chaînes polypeptidiques identiques possédant chacune un site actif) et sous forme allongée, prédominant dans les jonctions neuromusculaires. Elle est composée de trois sous-unités tétramériques catalytiques globulaires rattachées à une queue filamenteuse de nature collagène par des ponts S-S. L'acétylcholine et l'acétylcholinestérase présentent une complémentarité structurale. L'acétylcholinestérase possède deux sites récepteurs actifs :

- Un site anionique constitué par le groupement carboxylique de l'acide glutamique.
- Un site estérasique constitué par la fonction hydroxyle de la sérine, liée par une liaison hydrogène à l'azote d'un groupement imidazole de l'histidine. Cette liaison hydrogène augmente la nucléophilie de l'hydroxyle et facilite l'attaque du groupement ester.

La réaction d'hydrolyse se déroule en trois étapes (figure No. 5<sub>a</sub>) :

\* La première étape est représentée par la fixation de l'acétylcholine, d'une part sur le site anionique par une liaison électrostatique au niveau de l'ammonium quaternaire et d'autre part sur le site estérasique par une liaison hydrophobe permettant l'attache des groupements méthyle.

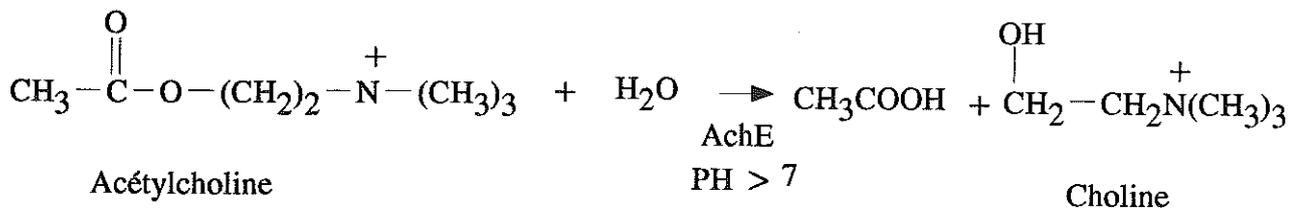
\* La deuxième étape comprend l'acétylation de l'enzyme par attaque nucléophile du carboxyle de l'ester par hydrolyse de la sérine, avec le départ d'une molécule de choline.

\* La troisième étape entraîne l'hydrolyse de l'acyl-enzyme, la molécule d'eau étant "activée" par une liaison hydrogène avec l'imidazole.

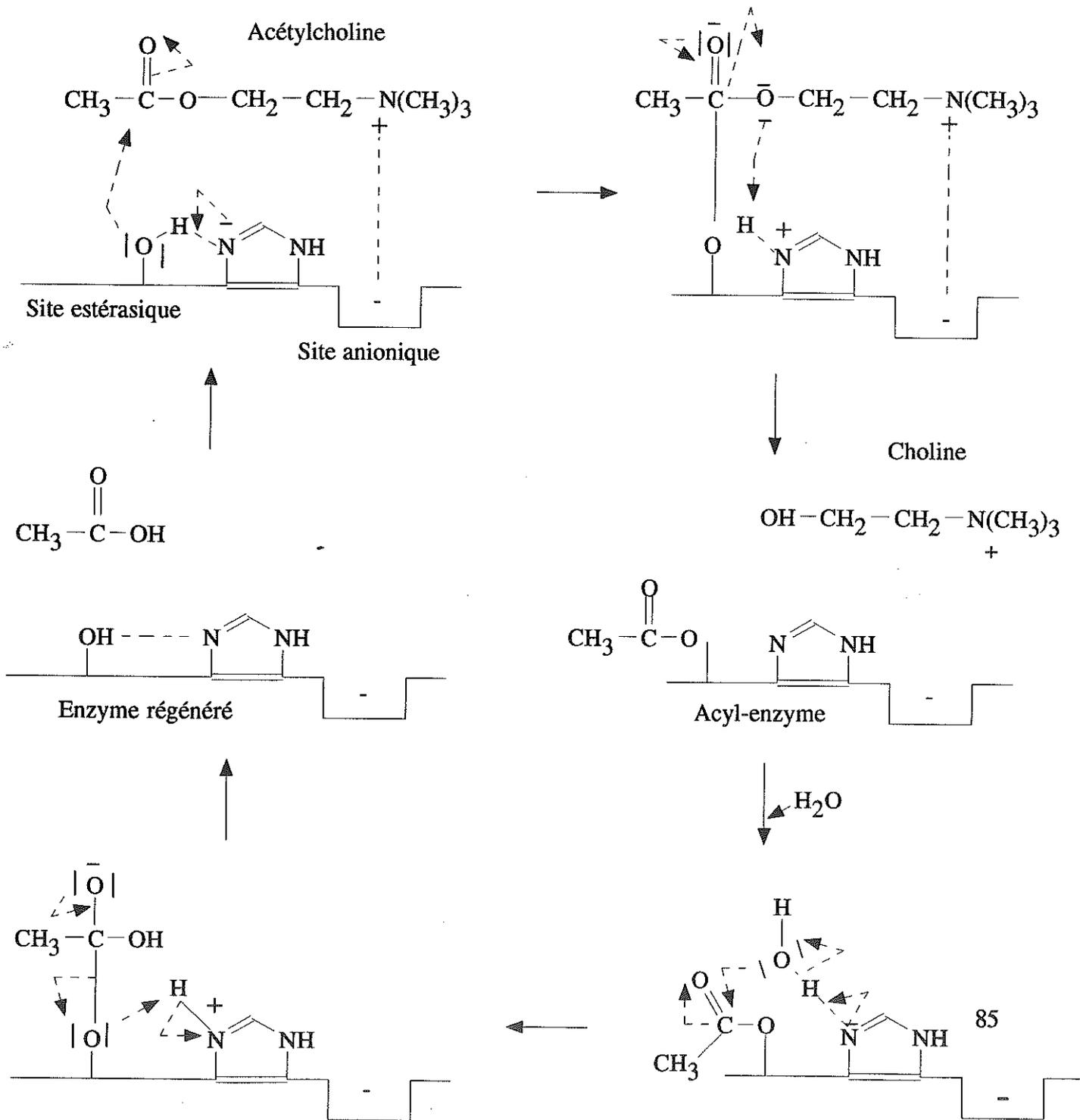
La désacétylation est beaucoup plus lente que l'acétylation et constitue l'étape limitante de la réaction d'hydrolyse. Le groupement imidazole de l'histidine joue le rôle d'accepteur de protons au cours de la réaction. Le maintien de la basicité de ce groupement est donc essentiel à la réaction, ainsi, à pH acide, la protonation de l'imidazole inhibe la réaction (Debord, 1983).

**Figure No. 5a - MECANISME D'ACTION DES ORGANOPHOSPHORES**

**D'après DEBORD (1983)**



**MECANISME D'ACTION DES CHOLINESTERASES**



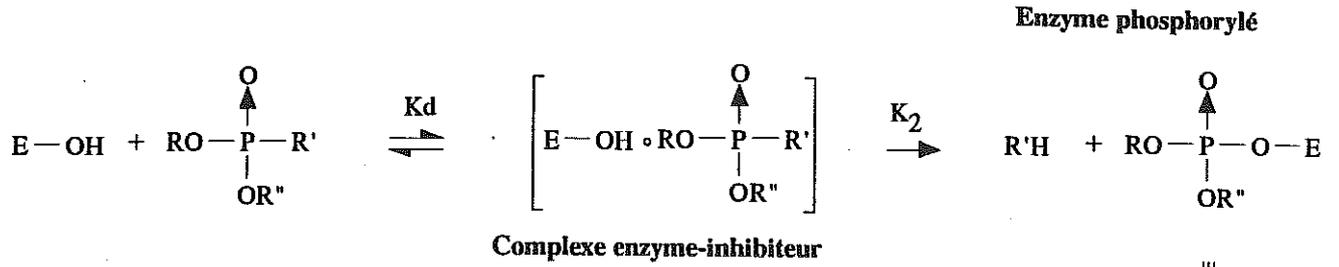
L'acétylcholinestérase est la molécule cible des organophosphorés (Fest *et al.*, 1973; Main *et al.*, 1979). Ils présentent une structure électronique leur permettant de se fixer sur le site actif. L'enzyme est alors phosphorylée. L'enzyme phosphorylée réagit lentement sur une molécule d'eau soit en se régénérant, soit en vieillissant. L'inhibition est donc partiellement réversible. Lorsque R est un groupement méthyle ou éthyle, la réaction de régénération est assez rapide, au contraire, les groupements alkyle secondaire ou tertiaire favorisent la stabilité de l'enzyme phosphorylé. Le pralidoxime est un antidote qui réactive les cholinestérases par l'attaque nucléophile du groupement oxime sur l'enzyme phosphorylé (figure No. 5<sub>b</sub>).

Les organophosphorés tout en privilégiant les cibles cholinestérasiques, inhibent aussi d'autres enzymes comme la trypsine (Mahendru *et al.*, 1983), les phosphatases alcalines (Mahendru *et al.*, 1983), ainsi que certaines carboxyestérases autres que les cholinestérases (Colin *et al.*, 1983). Les intoxications retardées par les organophosphorés semblent impliquer l'inhibition d'enzymes comme les "neurotoxic esterases (NTE)" localisées dans le cerveau.

Enfin, la structure des organophosphorés leur permettrait de se fixer sur les récepteurs de l'acétylcholine (Fest *et al.*, 1973).

**Figure No. 5b MECANISME D'ACTION DES CHOLINESTERASES**

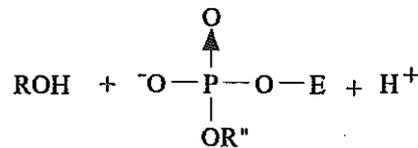
**INHIBITION PAR LES ORGANOPHOSPHORES**



Kd = constante de dissociation

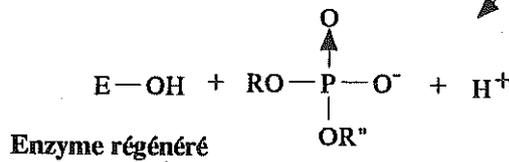
K2 = constante de phosphorylation

**Enzyme définitivement inhibé**

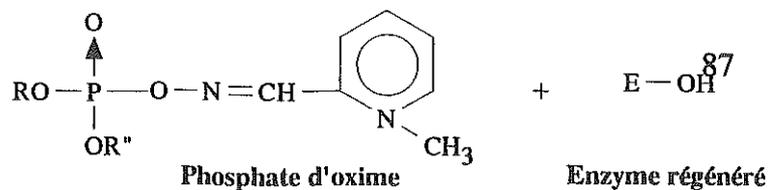
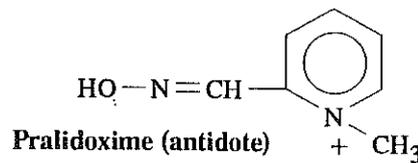


**Viellissement**  
(K<sub>4</sub>)

**Régénération**  
(K<sub>3</sub>)



**Réactivation par le pralidoxime**



5-2-1-1-2 - L'acétylcholinestérase des Nématodes, son rôle dans le mode d'action de certains antihelminthiques :

**\*\* Généralités :**

Le système cholinergique des Nématodes est la cible de nombreux composés anti-nématode pour le contrôle des formes parasitaires animales mais aussi végétales. La principale cible reste l'acétylcholinestérase du Nématode. Lorsque cette enzyme est inhibée, l'acétylcholine amorce, dans la synapse, une hyperexcitation immédiate, puis une désensibilisation des récepteurs musculaires, entraînant une paralysie. Pour les Nématodes parasites des végétaux, la mort semble être due à l'incapacité du parasite à trouver un hôte et donc à s'alimenter. Chez les formes parasitaires de l'animal, l'acétylcholinestérase est un produit sécrété en plus de sa fonction neurologique normale. Le rôle de cette acétylcholinestérase reste imprécis car les effets de son inhibition sur la relation hôte-parasite sont inconnus. Les Nématodes possèdent plusieurs formes moléculaires d'acétylcholinestérase et ces formes peuvent différer dans leurs propriétés et jouent un rôle important dans le comportement des Nématodes et la sensibilité aux nématocides.

L'acétylcholinestérase des Nématodes fut décrite pour la première fois, en 1952, par Bueding *et al.*, sur *Ascaris* (*in* Opperman et Chang, 1992). Depuis cette époque, la présence d'acétylcholinestérase a été confirmée par de nombreux essais biochimiques et histochimiques sur de nombreuses espèces de Nématodes comprenant : *A. lumbricoides* (Hutchinson et Probert, 1972, et Knowles et Casida, 1966 ; *in* Opperman et Chang, 1992), *P. equorum* (Aisa, 1982 ; *in* Opperman et Chang, 1992), *H. contortus* (Lee et Hodsdon, 1963 ; *in* Opperman et Chang, 1992), *T. colubriformis* (Lee et Hodsdon, 1963 ; *in* Opperman et Chang, 1992) et *Phocanema decipiens* (Goh et Davey, 1976 ; *in* Opperman et Chang, 1992) pour les parasites des animaux ; *Aphelenchus avenae* (Pree *et al.*, 1987 ; *in* Opperman *et al.*, 1992), *Aphelenchoides ritzema-boosi* (Voss et Speich, 1976 ; *in* Opperman et Chang, 1992), *Heterodera glycines* (Opperman *et al.*, 1990 ; *in* Opperman et Chang, 1992), *Helicotylenchus nannus* (Rohde *et al.*, 1960 ; *in* Opperman et Chang, 1992), *Meloidogyne arenaria* et *M. incognita* (Opperman *et al.*, 1990 ; *in* Opperman et Chang, 1992), *Pratylenchus penetrans* (Rohde *et al.*, 1960 ; *in* Opperman et Chang, 1992), *Paratrichodorus christei* (Rohde *et al.*, 1960 ; *in* Opperman et Chang, 1992) et *Xiphinema americanum* (Rohde *et al.*, 1960 ; *in* Opperman et Chang, 1992) pour les Nématodes parasites des végétaux ; *C. elegans* (Pertel

et al., 1976 ; in Opperman et Chang, 1992), et *Panagrellus redivivus* (Spurr, 1985 ; in Opperman et Chang, 1992), pour les Nématodes à vie libre. Des études biochimiques sur un homogénat brut de Nématodes, montrent une différence, entre espèces, dans l'affinité pour le substrat et la sensibilité aux inhibiteurs (un carbamate aromatique, l'ésérine, et un organophosphate, le paraoxon). Des études histochimiques entreprises par Lee en 1962, localisent l'acétylcholinestérase dans et autour de la cellule musculaire (avec une coloration moindre du système nerveux). De nombreuses espèces de nématodes (*Nippostrongylus brasiliensis*, *T. colubriformis*, *O. radiatum*, *Nematodirus battus* et *N. americanus*) sécrètent, en plus, une acétylcholinestérase par les glandes amphidiales et cette enzyme sécrétée, présente des différences notables avec celle isolée dans la jonction neuromusculaire (Ogilvie et al., 1973, et McLaren, 1976 ; in Opperman et Chang, 1992). L'enzyme isolée de *N. brasiliensis* a un poids moléculaire de 65 à 73 kDa comparable à celle décrite chez *C. elegans*, mais l'enzyme de *N. americanus* possède un poids moléculaire de 380 à 400 kDa (Horgath-scott et al., 1973 ; in Opperman et Chang, 1992). Cette variation semble indiquer que cette dernière enzyme est un polymère de plusieurs sous-unités, issue de l'évolution de l'enzyme de *N. brasiliensis*. Ces enzymes sont toutes de nature glycoprotéique. Le rôle exact de cette acétylcholinestérase sécrétée est imprécis (de plus tous les Nématodes gastro-intestinaux ne sécrètent pas cette acétylcholinestérase), mais l'hypothèse la plus probable semble être une fonction d'anesthésique local sur la paroi intestinale de l'hôte, empêchant le péristaltisme et l'expulsion du parasite. Il est aussi possible que l'acétylcholinestérase sécrétoire interfère avec la réponse immune de l'hôte, soit en neutralisant l'action de l'acétylcholine dans le système immunitaire, soit en altérant les propriétés antigéniques du Nématode même.

Des études sur les Nématodes libres, *C. elegans* (Jonhson et Russel, 1983 ; in Opperman et Chang, 1992), *Panagrellus* (Mulder et Bakker, 1988 ; in Opperman et Chang, 1992), sur les parasites des animaux *Ascaris* (Johnson et Stretton, 1980 ; in Opperman et Chang, 1992), sur les parasites des plantes, *Meloidogyne* (Chang et Opperman, 1991 ; in Opperman et Chang, 1992), *Heterodera* (Chang et Opperman, 1992 ; in Opperman et Chang, 1992), montrent que les acétylcholinestérases existent sous plusieurs formes moléculaires. Ces formes comprennent plusieurs classes, qui se différencient fortement dans leurs propriétés, par leur affinité pour le substrat, leur taille, leur sensibilité aux détergents et leur réponse aux inhibiteurs. L'abondance et la distribution anatomique de ces classes d'enzymes

semble être un facteur important pour l'impact des inhibiteurs dans le développement du Nématode. Les résultats de ces études indiquent que l'enzyme des Nématodes est un peu semblable, mais non identique, à l'acétylcholinestérase des Vertébrés.

Il y a trois principales classes d'acétylcholinestérases en fonction de la cinétique chez *C. elegans* et *M. incognita* (Chang et Opperman, 1991, Johnson et Russel, 1983 et Kolson et Russel, 1985 ; *in* Opperman et Chang, 1992), et seulement deux chez *H. glycines* (Chang *et al.*, 1992 ; *in* Opperman et Chang, 1992). Les différences de classes d'acétylcholinestérases entre espèces semblent mineures, et une large similitude existe entre groupes fortement divergents. Des études biochimiques établissent que ces classes différaient sur un grand nombre de paramètres, comprenant la sensibilité aux inhibiteurs et aux détergents, la thermolabilité, et l'affinité pour le substrat. Pour exemple, la classe C montre une affinité très importante pour l'acétylcholine, respectivement 1000 fois et 4500 fois plus forte que la classe A et que la classe B. Cette classe C est aussi résistante aux carbamates inhibiteurs comme l'ésérine. Une analyse structurale des classes A et B indique qu'aucune de ces enzymes ne possède la "queue de collagène" associée à de nombreuses acétylcholinestérases isolées d'autres espèces animales. Au contraire, elles semblent se comporter comme des molécules globulaires hydrophobes, suggérant une association de type membranaire. Finalement, chaque classe semble posséder des épitopes immunologiques distincts des autres. En résumé, ces informations confirment le fait que si ces enzymes dérivent d'un ancêtre commun, elles divergent maintenant significativement.

#### **\*\* Rétablissement du Nématode après exposition aux inhibiteurs :**

Les carbamates et les organophosphorés nématocides se lient avec l'acétylcholinestérase de manière similaire à l'acétylcholine. Après cette liaison, un groupement-débris est libéré et les résidus de sérine du site actif sont soit carbamylés, soit phosphorylés. L'hydrolyse pour régénérer l'enzyme libre existe aussi, mais elle est plus lente que l'acétylation de l'acétylcholinestérase. Cette étape est particulièrement lente pour l'enzyme phosphorylée. Une caractéristique commune aux carbamates inhibiteurs de l'acétylcholinestérase est leur interaction réversible avec l'enzyme, permettant un rétablissement du Nématode après l'exposition à ce type de nématocides (démonstré pour les parasites des végétaux par Mulder *et al.*, 1988 et Bunt, 1975 ; *in* Opperman et Chang, 1992). Au contraire, les organophosphorés forment une liaison irréversible, car le niveau de

déphosphorylation est négligeable. Cependant, Mulder *et al.*, en 1988 (*in* Opperman et Chang, 1992), montrèrent que le degré de déphosphorylation de l'acétylcholinestérase traitée par l'éthoprop était semblable à celui observé avec l'aldicarb (cet exemple suggérant la possibilité de rétablissement des Nématodes après exposition aux organophosphorés). L'analyse de la récupération d'acétylcholinestérase amphidiale de *M. javanica*, après exposition à l'aldicarb et à l'éthoprop, en utilisant une coloration histochimique du Nématode entier, montre que le temps de récupération reste important pour l'aldicarb, et seulement 45% de récupération sont observés chez les Nématodes traités avec l'éthoprop. Opperman *et al.* en 1991 montrent que chez *C. elegans* la récupération du nématode est rapide après une exposition de 24h aux carbamates et aux organophosphorés. L'étude de l'acétylcholinestérase brute des Nématodes révèle que la restauration complète de l'activité enzymatique, chez les sujets traités à l'aldicarb, est achevée après 24h de récupération. L'acétylcholinestérase inhibée par le fénamiphos ne possède pas les mêmes propriétés de réactivation, seulement 10% de l'activité enzymatique (comparée à celle des Nématodes non traités) est observée après 24 h de récupération. Mais ce faible taux de récupération semble suffisant pour restaurer une motilité au nématode. En conclusion, il est certain que les Nématodes sont capables de se remettre des effets des organophosphorés et carbamates nématocides.

### **\*\* L'inhibition de l'acétylcholinestérase et le comportement du Nématode :**

La relation entre l'inhibition de l'acétylcholinestérase et les effets sur les Nématodes *in vivo*, n'est pas claire. Des souches mutantes de *C. elegans* ayant perdue les classes A et B d'acétylcholinestérase, sont capables de se mouvoir avec peu d'affaiblissement même si elles ne possèdent que 5% d'acétylcholinestérase de type sauvage. Les Nématodes qui sont paralysés par les carbamates, semblent encore avoir un important pourcentage d'activité acétylcholinestérasique (en comparaison avec les sujets non traités). Des études sur la cinétique de l'inhibition acétylcholinestérasique par le carbamate et l'aldicarb, montrent que celle-ci est biphasique : 50% de cette activité est rapidement perdue, alors que la partie restante est inhibée plus lentement. L'inhibition complète est obtenue en 24h d'exposition constante. De cette observation résulte le partage de l'acétylcholinestérase en deux compartiments dans le Nématode. Un premier compartiment, représenté par la synapse neuromusculaire, est inactivé rapidement : c'est le compartiment "relevant du comportement"

("behaviorally relevant"). Le second compartiment est inhibé plus lentement et peut être considéré comme le compartiment "ne relevant pas du comportement" ("behaviorally irrelevant"). Ces deux compartiments semblent séparés par une membrane lipidique (expérimentation avec un détergent : la saponine). La paralysie apparaît lorsque l'acétylcholinestérase du domaine "relevant du comportement" est inhibée en dessous de 5% de son niveau normal.

**\*\* Le rôle des isoformes de l'acétylcholinestérase dans la sensibilité aux nématocides :**

Les fonctions spécifiques de chaque classe d'acétylcholinestérase ne sont pas encore connues. Une souche de *C. elegans* mutante déficiente en une seule classe, ne montre pas d'anomalies du développement. Une telle souche ayant perdu la classe C et une des deux autres classes semble être complètement fonctionnelle. Les souches ayant perdu les classes A et B semblent légèrement incoordonnées (prouvant que la classe C seule n'est pas suffisante pour une motilité normale). Cependant, ces derniers Nématodes étant aptes à la reproduction et normalement développés, la classe C peut donc compenser en partie la perte des deux autres classes. Cette souche est aussi paralysée par l'aldicarb à une concentration de 100 $\mu$ g (prouvant que la classe C est indispensable en l'absence des classes A et B). De plus la mutation éliminant tous les gènes de l'acétylcholinestérase est létale. En présence de 200 $\mu$ g d'aldicarb, seules les souches de type sauvage, et les souches contenant seulement les classes B et C, peuvent survivre et se reproduire. Puisque la classe C est inhibée à cette concentration d'aldicarb, il semble que la classe C ne soit pas nécessaire pour la croissance et le développement normaux, en présence de la classe B. En conclusion, il apparaît que ces classes sont membres d'une même famille enzymatique aux fonctions se chevauchant, aucune d'elles n'étant indispensable en présence des autres (Kolson *et al.*, 1985).

Les jonctions neuromusculaires, chez le Nématode, sont formées par des cellules musculaires envoyant une excroissance à l'anneau nerveux et aux cordons. Les études de colorations histochimiques n'ont pas, jusqu'à présent, une sensibilité suffisante pour localiser les différentes classes dans des localisations précises de l'anatomie du Nématode. La coloration est cependant plus prononcée dans les cordons nerveux ventraux et dorsaux. La présence d'acétylcholinestérase est aussi observée autour de l'anneau nerveux et de la valve pharyngo-intestinale. Des colorations avec des anticorps anti-classe C montrent chez *C.*

*elegans* que cette classe est localisée dans les cellules CAN (Canal Associated Neurons : une paire de neurones associés aux canaux excréteurs). La fonction de ces cellules est inconnue bien qu'essentielles à la survie du Nématode). Cependant la viabilité des souches mutantes déficientes en classe C semble suggérer que l'acétylcholinestérase n'est pas indispensable à la fonction des cellules CAN (Johnson *et al.*, 1988 ; *in* Opperman et Chang, 1992).

Des études sur la localisation de deux classes d'acétylcholinestérase d'*Ascaris* ont révélées la présence :

- d'une forme de haut poids moléculaire (comparable à la classe A) localisée dans les cellules musculaires antérieures à la vulve. Ces cellules sont responsable de la propagation des vagues nécessaires au mouvement du Nématode dans l'hôte.

- d'une forme de bas poids moléculaire (comparable à la classe B) localisée dans les cellules musculaires postérieures à la vulve, ayant un rôle limité dans la motilité du Nématode. Si l'on considère la fraction localisée antérieurement comme analogue au compartiment "relevant du comportement" des autres Nématodes, alors les classes solubles de haut poids moléculaire sont localisées à la jonction neuromusculaire où elles forment une barrière dans la synapse autour du récepteur de l'acétylcholine. Ces enzymes inactivent rapidement les molécules d'acétylcholine qui sont continuellement libérées dans la synapse, maintenant la tonicité des muscles et permettant la génération des potentiels d'action. La réserve intercellulaire de cette enzyme, la rend immédiatement accessible aux molécules inhibitrices. Du fait de la plus grande sensibilité de cette classe aux carbamates et organophosphorés, l'inhibition apparaît rapidement après l'exposition. Ce modèle explique l'attaque rapide de paralysie observée chez les Nématodes exposés aux nématocides anticholinergiques. La fraction de bas poids moléculaire, soluble avec détergent (classes C et B) semble être inhibée plus lentement du fait de leur séparation par une membrane cellulaire de l'espace intercellulaire (Johnson *et al.*, 1980 ; *in* Opperman et Chang, 1992).

Des Nématodes sous une exposition constante de nématocides ont montré une tolérance ou une insensibilité à de tels traitements (Tannich *et al.*, 1991 et Mann *et al.*, 1991 ; *in* Opperman et Chang, 1992). La réactivation de l'enzyme après un traitement aux carbamates serait due à une instabilité de la liaison covalente plutôt qu'à une synthèse d'une nouvelle enzyme (processus passif) (Ravdin *et al.*, 1986 ; *in* Opperman et Chang, 1992). Une perte de sensibilité aux inhibiteurs entrainerait une réactivation précoce des classes C et B après l'exposition. Les observations rapportant que ces enzymes sont sécrétées à la jonction

neuromusculaire en réponse à l'inhibition de la classe A ou compensée par d'autres mécanismes, restent à démontrer.

**\*\* Les gènes de l'acétylcholinestérase chez *C. elegans* :**

Johnson *et al.*, en 1988 entreprirent une étude génétique détaillée, sur des mutants acétylcholinestérase-déficients de *C. elegans*. Cette analyse a montré que les classes d'acétylcholinestérase chez *C. elegans* semble être codées par trois gènes de structure non liés (*ace-1* X, *ace-2* I, *ace-3* II), et les nombreuses formes dans chaque classe peuvent être produites par des modifications post-translationnelles. La perte d'une simple classe d'acétylcholinestérase par une mutation suppressive, n'a pas d'effet apparent sur le phénotype du Nématode. Des souches mutantes ayant perdu *ace-1* et *ace-2*, présentent des mouvements incoordonnés mais se développent normalement. Les Nématodes ayant perdu *ace-3* et un des deux autres gènes semblent normaux mises à part de légères difficultés de posture. La perte des trois classes est létale. Il apparaît que ces classes enzymatiques ont des fonctions se chevauchant, fondées sur les phénotypes d'un seul mutant, il est aussi possible qu'aucune de ces classes ne possède une fonction essentielle unique. Les phénotypes de ces trois doubles mutants montrent qu'un *ace-1* et un *ace-2* fonctionnels sont nécessaires pour un mouvement normal du Nématode. La viabilité du ver demande le fonctionnement d'au moins un des trois gènes. La viabilité du triple mutant peut être restaurée par l'incorporation d'une mutation dans le gène codant pour la choline transférase, une enzyme de synthèse de l'acétylcholine. Ces derniers mutants perdent alors un système cholinergique fonctionnel et sont sévèrement incoordonnés, mais restent capables de grandir et de se reproduire.

Une analyse de la mosaïque génétique des souches triples mutantes-*ace* montre une duplication instable de la portion contenant le gène *ace-1* sur le chromosome X. Les lignées cellulaires du système nerveux et du tissu musculaire du Nématode divergent précocement pendant l'embryogénèse, rendant possible l'obtention d'animaux ayant perdu leur acétylcholinestérase dans un tissu ou dans l'autre. Ces expériences ont montré que l'acétylcholinestérase n'est indispensable, pour les Nématodes, que dans la synapse neuromusculaire (les animaux ayant perdu cette acétylcholinestérase neuromusculaire ne sont pas viables). La présence ou l'absence de cette enzyme à la jonction neurone-neurone dans le système nerveux ne présente pas d'effets détectables sur la viabilité et le développement du nématode. Ces résultats suggèrent que le système cholinergique des Nématodes se caractérise par une modulation, plutôt qu'une régulation, de l'activité musculaire.

### 5-2-1-2 - Les cholinomimétiques :

En se fixant sur les récepteurs post-synaptiques, ils provoquent une dépolarisation de la fibre musculaire à la fois intense et réversible. Les imidazothiazoles (lévamisole, tétramisole) et les tétrahydropyrimidines (pyrantel, morantel), en sont les meilleurs représentants. La paralysie spastique du ver est réversible et permet son application dans l'épreuve de paralysie larvaire, utilisée pour la détection des résistances à ces produits. A forte concentration, les imidazothiazoles pourraient également interférer avec le métabolisme énergétique des helminthes.

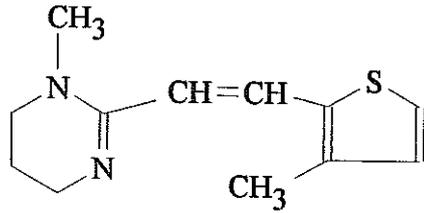
#### 5-2-1-2-1 - LES TETRAHYDROPYRIMIDINES :

##### A) LE PYRANTEL:

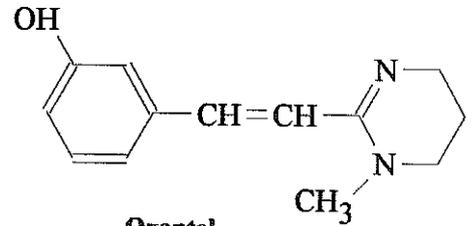
###### **\*\* Chimie et pharmacocinétique :**

Le pyrantel est le 1,4,5,6-tétrahydro-1-méthyl-2-[2-(2-thiényle)vinyle]pyrimidine ( $C_{11}H_{14}N_2S$  ; poids moléculaire, 206,3), (figure No. 6). Il est disponible sous forme de sels avec le pamoate ( $C_{34}H_{30}N_2O_6S$  ; poids moléculaire, 594,69 ; Pfizer). Il se présente comme une poudre cristalline jaune, sans goût, insoluble dans l'eau. Il peut aussi se présenter sous forme de tartrate ( $C_{18}H_{20}N_2O_6S$  ; poids moléculaire, 392, Pfizer), qui est soluble dans l'eau (180 mg/ml). Le pamoate de pyrantel est synthétisé pour donner un antihelminthique qui est peu absorbé par l'intestin. Environ 50 à 70% de la dose ingérée sont excrétés dans les fèces, et la concentration plasmatique n'est pas supérieure à 1  $\mu\text{g/ml}$  (Davis, 1973 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Le quart de la fraction absorbée est recyclé par la bile.

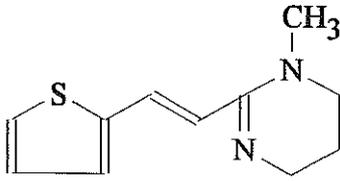
**Figure No. 6 - LES CHOLINOMIMETIQUES**



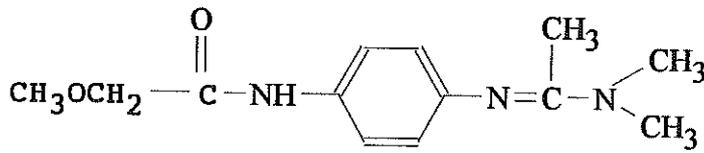
**Morantel**



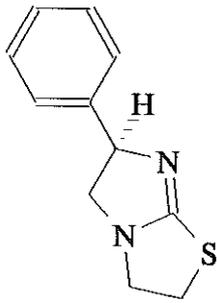
**Oxantel**



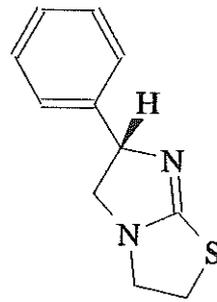
**Pyrantel**



**Amidantel**



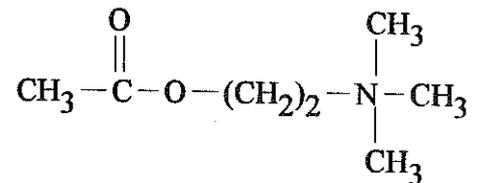
**R (+) Dexamisole**



**S (-) Lévamisole**

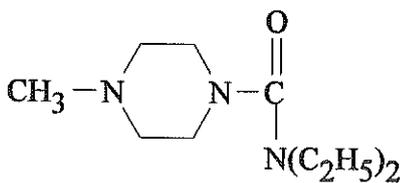


**Tétramisole**

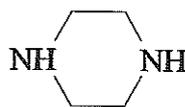


**Acétylcholine**

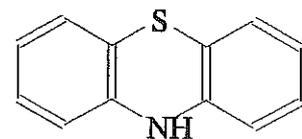
**LES ANTICHOLINERGIQUES**



**Diéthylcarbamazine**



**Pipérazine**



**Phénothiazine**

**(dibenzothiazine)**

## **\*\* Pharmacologie :**

Le tartrate de pyrantel montre une activité caractéristique comme agent dépolarisant, bloqueur neuromusculaire sur une préparation de nerf phrénique de rat, sur moelle épinière de poussin et sur les muscles abdominaux de crapaud (Aubry *et al.*, 1970, Eyre, 1970 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Chez le chien, une injection intraveineuse de tartrate de pyrantel provoque rapidement une hypertension et augmente la fréquence et l'intensité de la respiration. Ces effets sont antagonisés par l'hexaméthonium (un bloqueur ganglionnaire : ganglioplégique, inhibant l'acétylcholine dans les ganglions, les médullosurrénales et les chémorécepteurs). L'abolition de la réponse par l'hexaméthonium, suggère que le pyrantel agit en stimulant les récepteurs nicotiniques des synapses ganglionnaires. La drogue provoque la contraction de l'iléon de cobaye, contraction antagonisée par l'atropine, montrant que les récepteurs muscariniques sont stimulés, soit directement, soit indirectement pour induire cette contraction. Il potentialise donc l'acétylcholine. De fortes concentrations de pyrantel inhibent l'acétylcholinestérase des érythrocytes de mouton. Enfin, il représente un faible inhibiteur de la butylcholinestérase du plasma de cheval.

## **\*\* Toxicologie :**

La DL<sub>50</sub> chez la souris est de 175 mg/kg et de 170 mg/kg chez le rat. Une administration quotidienne de 20 mg/kg/j au chien ne conduit à aucun changement attribuable à la drogue. Les chiens recevant des doses de 50-75 mg/kg/j pendant 90 jours montrent des symptômes sporadiques à titre de prostration, vomissements et dépression respiratoire. Un animal décédé, présente une entérite aiguë, hémorragie fécale et dépression du système nerveux central (O'Brien, 1970 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

La dose de tartrate de pyrantel orale maximale tolérée chez le mouton est de 175 mg/kg (Austin *et al.*, 1966 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). La toxicité pour le mouton adulte varie suivant la méthode d'administration d'une solution de tartrate de pyrantel dans de l'eau (Cornwell, 1966). La voie orale avec une solution à 15% entraîne la mort à 200 mg/kg, en utilisant une solution à 5% et la voie orale avec un pistolet doseur à tube oesophagien, la mort arrive à 500 mg/kg mais pas à 400 mg/kg. Avec une prémédication au sulfate de cuivre, pour stimuler la fermeture de la gouttière oesophagienne, une dose de 100 mg/kg est tolérée.

## **B) LE MORANTEL :**

### **\*\* Chimie et pharmacocinétique :**

Le tartrate de morantel (Pfizer) est le dérivé méthylé en 3 du tartarate de pyrantel, ou le 1,4,5,6-tétrahydro-1-méthyl-2-[2-(3-méthyl-2-thiényl)éthényl]pyrimidine de poids moléculaire : 220,3 (figure No. 6).

Chez le mouton, cette molécule est absorbée rapidement par la partie supérieure de l'intestin grêle, et un pic plasmatique est obtenu 4 à 6 heures après l'administration. 70% du morantel sont excrétés sous forme de métabolites dans les 96 premières heures, le reste est excrété dans les fèces.

### **\*\* Toxicologie :**

La DL<sub>50</sub> orale chez la souris se situe entre 300 et 437 mg/kg et de 927 mg/kg chez le rat. La DL<sub>50</sub> en intrapéritonéale est de 28 mg/kg chez la souris. Les rats mourant à des concentrations fortes, présentent des convulsions, érections des poils et ataxie (O'Brien, 1970; *in* Arundel *et al.*, 1983).

## **C) L'OXANTEL :**

Le pamoate d'oxantel ou le pamoate de 1-méthyl-1,4,5,6-tétrahydro-2-(3-hydroxystyryl)pyrimidine de poids moléculaire : 604,67 (figure No. 6), est une poudre cristalline jaune pratiquement insoluble dans l'eau (Botero, 1978 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Après une administration orale le pamoate d'oxantel est peu absorbé et de fortes concentrations sont retrouvées dans le caecum et dans le colon (Garcia, 1976 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

## **D) MODE D'ACTION DES TETRAHYDROPYRIMIDINES :**

Le pyrantel, comme le lévamisole, est un antihelminthique paralysant les Nématodes. Le pyrantel provoque une contracture lente d'une préparation de muscle d'*Ascaris*. Il est 100 fois plus actif que l'acétylcholine pour cet effet. La pipérazine et la (+)-tubocurarine bloquent la réponse au pyrantel. Ces effets antagonistes ne sont pas observés avec une

préparation de muscle d'*Ascaris* traité au lévamisole (Coles, 1977 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Le pyrantel entraîne une dépolarisation et augmente le pic de fréquence de décharge sur le muscle d'*Ascaris*, effets antagonisés par la pipérazine (Aubry *et al.*, 1970 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

L'étude des courants intra-cellulaire et une technique de "Voltage Clamp" furent appliquées par Harrow *et al.*, en 1988, sur des cellules musculaires d'*A. suum* (région en "sac"), pour expliquer le mode d'action du morantel, du pyrantel et du lévamisole. Une microperfusion de chaque antihelminthique et de *o*-acétylcholine (Ach) augmente la conductance d'entrée de courant et dépolarise le potentiel membranaire. La potentialité relative de ces drogues est déterminée par la relation dose-conductance et montre :

morantel = pyrantel > lévamisole > acétylcholine

Des fortes doses de morantel (>10 micromoles) entraîne un antagonisme des réponses à l'acétylcholine. Les courants acétylcholine-induits sont mesurés sous "voltage clamp" (-80 à +10 mV). A des potentiels de membrane de -80 à 0 mV, la microperfusion d'acétylcholine induit un courant vers l'intérieur voltage dépendant. La relation courant-voltage est linéaire pour des potentiels de membrane de -30 à +10 mV. La relation est non linéaire pour des potentiels plus négatifs que -30 mV, et le degré de non-linéarité est dépendant de la concentration en acétylcholine. La relation courant-voltage pour le morantel, le pyrantel et le lévamisole possède aussi ces deux aspects de linéarité (de -30 à 0 mV) et de non-linéarité. Le potentiel reverse pour chaque agoniste, déterminé par extrapolation de la composante linéaire de la courbe courant-voltage, est approximativement de +10 mV pour les trois. Ceci prouve que les mêmes canaux à cations, perméables aux ions sodium et sans doute aux ions potassium, sont activés par l'acétylcholine et les antihelminthiques étudiés. Les auteurs concluent que le morantel, le pyrantel et le lévamisole agissent comme agonistes potentiels des récepteurs des membranes cellulaires de muscles d'*Ascaris*. Plusieurs études pour caractériser la pharmacologie des récepteurs à l'acétylcholine du muscle d'*Ascaris*, montrent un profil nicotinique (Natoff, 1969, Rozhkova *et al.*, 1980 ; *in* Harrow et Gratton, 1985). De tous les agents ayant une activité agoniste sur les récepteurs nicotiniques, les tétrahydropyrimidines semblent être les plus efficaces, mais paradoxalement, Pinnock *et al.*, en 1988, montrent que le pyrantel et le morantel sont de faibles agonistes des récepteurs nicotiniques d'un neurone de l'insecte *Periplaneta americana* (expliquant la faible activité insecticide et acaricide des tétrahydropyrimidine. Ces auteurs en enregistrant les courants

intracellulaires et par des techniques de "patch clamping", appliqués à un motoneurone du cafard, investissent l'activité cholinergique du morantel, du pyrantel et du lévamisole. L'application de ces agents et d'acétylcholine entraînent des variations dose-dépendantes de la conductance et une dépolarisation de la membrane du neurone. L'efficacité de chacune des drogues est : carbachol >> lévamisole > pyrantel > morantel

La mécamylamine, un antagoniste nicotinique, bloque l'action du lévamisole, du pyrantel, mais pas celle du GABA, indiquant leur action sur le même site. Les auteurs concluent que la faible action de ces composés sur l'insecte est due à leur faible activité d'agoniste cholinergique sur les neurones d'insecte, contrastant avec leur action potentielle d'agoniste sur les récepteurs à l'acétylcholine des nerfs et muscles d'helminthes. Cette différence d'action semble dévoiler une variabilité entre les propriétés des récepteurs à l'acétylcholine chez les insectes et les helminthes. Prichard, en 1972, note que le système de la fumarate réductase d'*H. contortus* est inhibé à de fortes concentrations ( $2,5 \times 10^{-3}$  M) de tartrate de morantel.

Hassoni *et al.*, en 1988 pratiquent un enregistrement électrique intracellulaire sur des neurones de la masse ganglionnaire sub-oesophagienne d'un escargot : *Helix aspersa*. Les neurones sont classés, les uns, en cellules H, inhibées par l'acétylcholine, les autres, en cellules D, excitées par l'acétylcholine. Les auteurs étudient alors l'action du lévamisole, du pyrantel, de l'amidantel, de l'amidantel déacylé et de l'hycanthone sur ces neurones en comparaison avec les effets de l'acétylcholine. Pour ce qui est du morantel et du pyrantel, ils sont respectivement  $1,12 \pm 0,13$  et  $2,56 \pm 0,26$  fois moins actifs que l'acétylcholine sur les neurones D (excités par l'Ach), et  $5,16 \pm 0,6$  et  $3,53 \pm 0,63$  fois moins actifs que l'acétylcholine sur les cellules H (inhibées par l'Ach) (pour comparaison le lévamisole est 11 fois moins actif sur H et 100 fois moins sur D). Aucun des antihelminthiques étudiés ne montre la même potentialité que l'acétylcholine, sauf peut être le morantel, approximativement équipotent à l'acétylcholine sur les cellules D. Les auteurs concluent que le morantel et le pyrantel possèdent une grande affinité pour les récepteurs de l'acétylcholine en comparaison avec les autres antihelminthiques étudiés. Sur les courbes dose-réponse il semble apparaître que les deux molécules sont agonistes sur les neurone d'*Helix*, et les études ioniques montrent que ces dernières activent les récepteurs liés aux mêmes canaux ioniques que l'acétylcholine. De plus l'hexaméthonium et la mécamylamine antagonisent réversiblement l'action du pyrantel, suggérant que ces composés agissent avec un récepteur

à l'acétylcholine ressemblant au type ganglionnaire nicotinique des Vertébrés.

Atchinson *et al.*, en 1992, étudient la toxicité comparative sur les Nématodes parasites et leurs hôtes, du lévamisole, du pyrantel, et de plusieurs analogues de la transmission cholinergique. La mesure de la contractibilité musculaire et du potentiel membranaire est effectué sur une préparation d'hémi-diaphragme de rat et sur des segments musculaires axiaux d'*H. contortus*. Le pyrantel entraîne une réduction dose et temps-dépendante des contractions nerveuses du diaphragme du rat. Ces effets sont potentialisés en augmentant la fréquence de stimulation du nerf phrénique de 0,5 à 50 Hz. Le lévamisole semble moins efficace que le pyrantel pour cet effet. Chez *H. contortus*, les deux composés entraînent une stimulation des contractions spastiques et provoquent une paralysie à des concentrations de 1 à 10  $\mu\text{M}$ , mimant l'action de la nicotine. Les antagonistes muscariniques et les antagonistes nicotiniques ne bloquent pas ces réponses. D'ailleurs, les antagonistes nicotiniques, et les antagonistes ou agonistes muscariniques ne présentent pas d'effets indépendants sur la contractibilité musculaire du parasite. L'action de blocage du lévamisole et du pyrantel sur *H. contortus* est associée à une dépolarisation membranaire du muscle. La d-turbocurarine ne bloque pas l'action dépolarisante du pyrantel, du lévamisole ou de la nicotine. Les auteurs concluent donc que :

- 1 - ces deux composés bloquent la contractibilité des muscles axiaux des nématodes en dépolarisant la membrane musculaire.

- 2 - le lévamisole et le pyrantel sont de meilleurs bloqueurs de la transmission neuromusculaire chez *H. contortus* que chez le rat.

- 3 - les deux composés bloquent la transmission à la jonction neuromusculaire des mammifères, par des mécanismes différents de ceux des Nématodes.

Ces résultats suggèrent que des différences importantes existent entre les récepteurs nicotiniques des Nématodes et ceux des mammifères.

Des précisions sur les effets électrophysiologiques du pyrantel et du morantel, ainsi que le développement des résistances seront données dans la partie décrivant le mode d'action du lévamisole, traitée plus loin.

## 5-2-1-2-2 - LES IMIDAZOTHIAZOLES : le lévamisole et le tétramisole :

### A) Chimie et pharmacocinétique :

Le lévamisole (Raeymaekers *et al.*, 1967 ; *in* Arundel *et al.*, 1983) est l'énantiomère lévogyre du tétramisole ou monochlorure de ( $\pm$ )-2,3,5,6-tétrahydro-6-phénylimidazo[2,1-b]thiazole (poids moléculaire : 204,29 + 36,46 ; Janssen Pharmaceutica), (figure No. 6). La plupart de l'activité antihelminthique du racémique réside est présente dans le lévamisole, qui est moins toxique et plus efficace que l'isomère dextrogyre : le dexamisole. Les deux isomères sont fortement solubles et stables dans les milieux aqueux acides. Dans les solutions alcalines, une hydrolyse ouvre le cycle thiazoline pour former l'OMPI insoluble [(-)-2-oxo-3-(2-mercapto-éthyl)-5-phénylimidazolidine].

Le lévamisole est rapidement absorbé par le tractus intestinal, la peau saine et au niveau des sites d'injection. Chez l'homme, le pic plasmatique atteignant 0,7  $\mu\text{g/ml}$  est obtenu en une à deux heures, après l'administration orale et unique de 150 mg (Graziani *et al.*, 1977). Toujours chez l'homme, le lévamisole a une demi-vie de 4 heures et est éliminé entièrement au bout de deux jours. Le volume de distribution du lévamisole suivant l'administration de 2,5 mg/kg à des hommes, est de  $110 \pm 10$  L, et reste indépendant de la dose. La clairance rénale est faible, de  $1,75 \pm 1,71$  L/h, en comparaison avec la clairance corporelle totale.

Le métabolisme du lévamisole a été étudié chez le rat où quatre mécanismes différents sont décrits (Boyd *et al.*, 1969 ; *in* Arundel *et al.*, 1983) :

- a) oxydation du cycle imidazole
- b) oxydation et c) hydrolyse du groupement thiazole
- d) hydroxylation en para du groupement phényl

Un des principaux métabolites du lévamisole est l'OMPI. Les  $\alpha$ -cétoaldéhydes, spécialement le glyoxal et le méthylglyoxal, sont des catalyseurs spécifiques pour l'hydrolyse du lévamisole en dérivé thiol de l'OMPI. Cette réaction est rapide à température ambiante et à pH faiblement alcalin (Van Belle et Janssen, 1979 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

## B) Mode d'action :

*In vitro* le lévamisole et le tétramisole produisent un effet stimulant et réversible, sur les ganglions du système nerveux autonome et sympathique des tissus intestinaux des mammifères. Ils produisent aussi une inhibition neuromusculaire, ressemblant à celle de la nicotine) sur des préparations de nerfs de muscle de poulet et de nerfs de diaphragme de rat (concentration de 10 à 30 mg/l) ; (Van Nueten *et al.*, 1972 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Le lévamisole induit une relaxation réversible de l'ileon KCl-dépolarisé du cobaye, à des concentrations de 2,5 à 40 mg/ml. Il inhibe aussi l'acétylcholinestérase des érythrocytes et du sérum : 50% d'inhibition sont obtenus à  $10^{-4}$  M (Van Den Bossche, 1976 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Bien que l'activité de stimulation réversible des ganglions soit obtenue entre  $2,6 \times 10^{-6}$  M et  $4,1 \times 10^{-5}$  M, l'inhibition des cholinestérases n'est probablement pas liée aux effets sur le système neuromusculaire. Une propriété importante du lévamisole est sa capacité à inhiber, à  $10^{-6}$  M, les phosphatases alcalines de plusieurs tissus de mammifères (sauf les isoenzymes intestinales, et placentaires). Cette inhibition est de type incompétitive (Van Belle *et al.*, 1972, 1976 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

Toujours *in vitro*, le lévamisole est rapidement et complètement absorbé par *A. suum* via un mécanisme transcuticulaire (Verhoeven *et al.*, 1976 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Cette remarque est compatible avec l'apparition rapide d'une contraction spastique du muscle d'*A. suum* induite par le lévamisole et le tétramisole (Van Nueten, 1972 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). L'incubation de larves et d'adultes en présence de lévamisole, provoque des contractions, suivies d'une paralysie tonique (Van Den Bossche, 1976 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). La réversibilité de cet effet dépend de l'espèce de vers, du stade du cycle de développement, de la concentration et des conditions d'incubation (Van Nueten 1972, Van Den Bossche, 1976 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Le lévamisole agirait donc comme un composé stimulant les ganglions et induirait ensuite une inhibition neuromusculaire par un mécanisme dépolarisant (Coles *et al.*, 1975 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

*In vivo*, les doses thérapeutiques de tétramisole, de lévamisole, ou de dexamisole, sont dénuées d'effets mesurables sur le système nerveux autonome, sur la thermorégulation, sur les réflexes, et sur le comportement général des souris et des rats. A des doses subtoxiques et toxiques, le tétramisole et ses énantiomères agissent comme convulsivants (Symoens *et al.*, 1979 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

*\* Le système fumarate réductase :*

Le lévamisole et le tétramisole interfèrent aussi avec le système fumarate réductase des mitochondries des Nématodes (Van Den Bossche, 1976 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Dans de nombreux vers parasites, le système fumarate réductase joue un rôle fondamental dans la production énergétique anaérobie des mitochondries. Bien qu'il soit certain que le lévamisole influence de façon prépondérante le système neuromusculaire des Nématodes, il est possible que pour certains helminthes, l'inhibition du système fumarate réductase contribue à l'efficacité antihelminthique du lévamisole (Van Den Bossche, 1976 ; Behm et Bryant, 1979 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

*\* Electrophysiologie de l'action du lévamisole, du pyrantel et du morantel :*

Les canaux non-sélectifs aux cations et ouvert par l'acétylcholine sont aussi activés par divers agonistes nicotiques tels que le lévamisole, le pyrantel et le morantel (Colquhoun *et al.*, 1991 ; *in* Martin, 1992). Harrow et Gration, en 1985 (*in* Martin, 1992), en utilisant des techniques de "current-clamp" et de "voltage-clamp", examinent le mode d'action de ces trois antihelminthiques sur la région "en sac" du muscle d'*Ascaris*. Les microperfusions, d'un part d'acétylcholine et d'autre part de ces trois antihelminthiques augmentent la conductance d'entrée et dépolarisent le potentiel de membrane du muscle. Ces antihelminthiques ouvrent un canal ionique perméable à la fois aux ions sodium et potassium. L'acétylcholine et le pyrantel semblent alors agir sur le même récepteur. Le morantel et le pyrantel sont des agonistes plus puissants que le lévamisole ; ce dernier étant lui-même plus efficace que l'acétylcholine.

Colquhoun et Sakmann, en 1985 (*in* Martin, 1992), expliquent que le lévamisole, le pyrantel et le morantel sont des cations organiques et, tout en agissant comme agonistes ouvreurs de canal, peuvent pénétrer dans les canaux ioniques sous l'influence du champ électrique. Ils sont trop volumineux pour passer à travers le canal comme le potassium et le sodium et peuvent donc entraîner un blocage du canal voltage-sensible ouvert (Colquhoun et

Sakmann, 1985 ; *in* Martin, 1992). Cette hypothèse confirme les études de Harrow *et al.*, où de basses concentrations d'antihelminthiques agissent comme un agoniste ouvreur de canal, et de fortes concentrations produisent alors un blocage de ce canal ionique.

\* *Existence de canaux uniquement activés par l'acétylcholine, le lévamisole, le pyrantel et le morantel :*

Des canaux uniquement activés par l'acétylcholine, furent détectés sur des fragments musculaires d'*Ascaris* par Pennington et Martin, en 1990 (*in* Martin, 1992). Ces canaux sont non-sélectifs aux cations et possèdent deux conductances (40-50 pS et 25-35 pS).

Un canal uniquement activé par le lévamisole a été aussi détecté par Robertson et Martin, en 1993. Ce canal ionique semble sélectif aux cations et possède les mêmes propriétés cinétiques que les canaux activés par l'acétylcholine lorsque le lévamisole est appliqué à de basses concentrations. A de fortes concentrations en lévamisole un blocage "clignotant" est observé durant l'hyperpolarisation. Ce vacillement sensible au voltage, visible avec le lévamisole, montre que certains antihelminthiques peuvent aussi agir comme bloqueurs de canaux, en plus de leur action d'agonistes. De plus, seule la forme non-ionisée du lévamisole peu diffuser à travers la barrière lipidique représentée par la cuticule du Nématode, pour atteindre le site actif du récepteur extra-cellulaire du muscle.

Le pyrantel et le morantel semblent tous les deux actifs sur un même canal sélectif aux cations avec une conductance similaire.

\* *Inhibition de la Ca<sup>2+</sup>-ATPase :*

Les adénosine 5'-triphosphatases (ATPases) ont été caractérisées comme jouant un rôle important dans la neurotransmission, la phosphorylation oxydative et le transport membranaire... Ces ATPase sont présentes chez les helminthes. Parmi celles-ci, la Ca<sup>2+</sup>-ATPase prend une part importante du système de transport ATP-dépendant lié au calcium dans les membranes plasmiques (Carafoli, 1987 ; *in* Agarwal *et al.*, 1992). Cette enzyme joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup>. Les téguments du Trématode *S. mansoni* sont riches en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, ainsi qu'en Ca<sup>2+</sup>-ATPase. Agarwal *et al.*, en 1992, caractérisent cette enzyme sur un Nématode, filaire de bovin, *Setaria cervi*, possédant une distribution égale dans la couche cuticule-muscle-hypoderme, organes génitaux

et tissus gastro-intestinaux du Nématode. Certains antihelminthiques comme la diéthylcarbamazine, le lévamisole et la suramine inhibent cette enzyme (lévamisole moins efficace que la diéthylcarbamazine), (*in Agarwal et al.*, 1992).

Le lévamisole agit aussi comme immunostimulant, en restaurant les mécanismes immunitaires cellulaires des lymphocytes T périphériques. Il a été utilisé avec succès dans le traitement de divers cancers.

### C) Résistance :

En 1979, Le Jambre *et al.*, décrivent une résistance de famille du tartrate de morantel d'une souche d'*Ostertagia* chez le mouton, résistante au lévamisole (*in Arundel et al.*, 1983). Sangster *et al.*, en 1979, décrivent pour la première fois une résistance au lévamisole chez le mouton, de *T. colubriformis* et *O. circumcincta* (*in Arundel et al.*, 1983). En 1981, Green *et al.*, décrivent le premier cas de résistance d'*H. contortus*, au lévamisole, chez la chèvre (*in Rolfe*, 1990). Le premier cas en Angleterre, est une résistance d'*O. circumcincta* et de *T. Axei* chez le mouton, qui a été décrite en 1986 par Britt (*in Taylor et al.*, 1990). Une résistance, *in vivo*, au lévamisole a été décrite pour la première fois sur *O. ostertagi*, en 1979, par Sangster *et al.* (*in Coles*, 1988). En Afrique du sud, en 1988, Malan *et al.* décrivent une résistance au lévamisole d'une souche de *Libyostongylus douglassi* chez les autruches, et Van Wyk *et al.*, en 1989, constatent la résistance au lévamisole/morantel de deux souches d'*H. contortus* (*in Rolfe*, 1990). Van Wyk *et al.*, en 1990, en Afrique du sud, décrivent une résistance au lévamisole/morantel d'une souche de *T. colubriformis* chez le mouton.

La résistance aux antihelminthiques comme le lévamisole et le tartrate de morantel représente un problème majeur pour le contrôle des *Trichostrongylidae* chez le mouton dès les années 80. La possibilité que le lévamisole et le morantel possèdent un même site d'action est approuvée par l'existence de souches de *Trichostrongylidae* résistantes aux deux composés après une unique sélection par le lévamisole (Sangster *et al.*, 1979 ; *in Sangster et al.*, 1988). Cependant des souches seulement résistantes au morantel existent (Waller *et al.*, 1986 ; *in Sangster et al.*, 1988). Ainsi Bjorn *et al.*, en 1990 détectent une résistance croisée entre le pyrantel et le lévamisole pour *Oesophagostomum quadrispinulatum* et *O. dentatum* chez le mouton. Ces auteurs concluent que la sélection par le lévamisole entraînant une résistance,

conduit automatiquement à une résistance au pyrantel, tandis que la sélection par le pyrantel ne développe de résistance que vis-à-vis de lui-même. Sangster *et al.*, en 1988, ont investi les mécanismes possibles comme la réduction de l'apport en drogue, l'augmentation de son métabolisme et un changement dans le site d'action. Une souche sensible et une souche résistante au lévamisole/morantel, ainsi qu'une souche uniquement résistante au morantel de *T. colubriformis*, absorbent toutes le lévamisole dans les mêmes proportions (Sangster *et al.*, 1988). Dans ces trois souches, 45 à 52 % du lévamisole absorbé est converti en un métabolite non-identifié. Le lévamisole, le morantel, certains de leurs analogues et d'autres agonistes cholinergiques (le carbachol, le diméthylphényl de pipérazinium, le bromure de béphénium), sont tous des inhibiteurs moins efficaces de l'éclosion des oeufs des souches résistantes au lévamisole de *T. colubriformis* et *H. contortus*, que des souches sensibles des mêmes espèces (Sangster *et al.*, 1988). Ces données suggèrent que la résistance est due à une réduction du nombre de récepteurs au lévamisole ou à une chute de l'affinité de ces récepteurs pour le lévamisole, chez les *Trichostrongylidae* résistants (Sangster *et al.*, 1988).

Le lévamisole est hautement neurotoxique pour les Nématodes entraînant une hypercontraction spastique du muscle, suivie par une paralysie flasque et la mort. Le lévamisole apparaît donc comme un analogue nicotinique ciblant son action sur un récepteur à l'acétylcholine présent sur les muscles du Nématode. Ce récepteur cholinergique est indispensable pour un comportement moteur coordonné mais pas pour la viabilité du Nématode. Une mutation, apparaissant dans un des gènes réduisant la fonction du récepteur, permet au mutant du Nématode *C. elegans* d'échapper aux effets agonistes du lévamisole et de survivre à des doses importantes de lévamisole (Brenner, 1974 ; Lewis *et al.*, 1980 ; *in* Lewis et Berberich, 1992). En utilisant un dérivé aminé et tritié du lévamisole comme ligand, un récepteur avec un profil pharmacologique cholinergique et nicotinique a été isolé par Lewis *et al.*, en 1987a (*in* Lewis et Berberich, 1992), sur un homogénat brut de la souche sauvage du Nématode. Les mutants extrêmement résistants au lévamisole possèdent une activité de liaison du lévamisole tritié déficiente ou transformée (Lewis et Berberich, 1987b ; *in* Lewis et Berberich, 1992).

A de fortes concentrations de lévamisole (30 $\mu$ M et 90 $\mu$ M), un blocage "vacillant" (précédemment décrit) du canal activé par le lévamisole est observé à des potentiels hyperpolarisés (Robertson et Martin, 1993, sur muscle d'*Ascaris*). A ces concentrations élevées de lévamisole, une longue période de fermeture des canaux activés par le lévamisole

sépare les ouvertures "en bouquet". Cette latence est observée à la fois pour des potentiels dépolarisés et hyperpolarisés. Cette très longue période semble correspondre à un lent processus de désensibilisation. Cette désensibilisation, produite par le lévamisole, peut avoir un effet thérapeutique important : certains *Ascaris* continuellement traités par des fortes doses de lévamisole se rétablissent de la paralysie induite par le lévamisole.

### 5-2-1-3 - Les anticholinergiques :

Chez les helminthes comme chez les Vertébrés le neurotransmetteur stimulant la fibre musculaire est l'acétylcholine, mais le neurotransmetteur inhibiteur sur les cordons nerveux du ver est l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). La pipérazine et ses dérivés miment le GABA et provoquent une paralysie flasque réversible chez les Nématodes du genre *Ascaris*.

Les avermectines possèdent aussi cette activité dite GABAergique.

#### 5-2-1-3-1 - LES AVERMECTINES:

L'ivermectine et l'abamectine, membres de la famille des avermectines, composés de type macrolide (lactones macrocycliques), furent introduites sur le marché dans les années 80, comme, respectivement, antiparasitaires vétérinaires (1981) et pesticides agricoles (1985).

L'activité antihelminthique des avermectines fut décrite en premier par Burg *et al.*, Egerton *et al.*, Miller *et al.* en 1979 (*in* Campbell, 1989). L'origine du terme "Avermectine" dérive de la formulation anglo-saxonne "Anti Verms and Ectoparasites activity".

#### A) Chimie des avermectines:

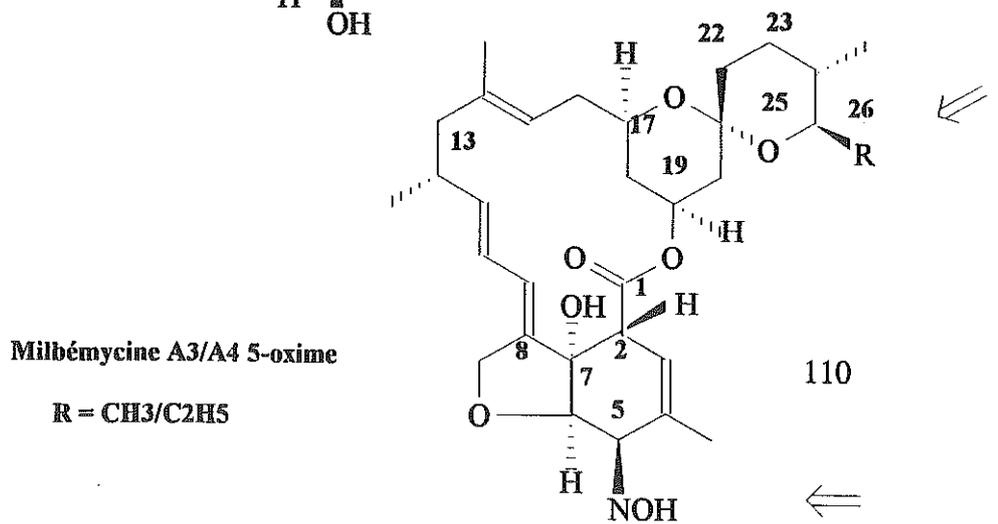
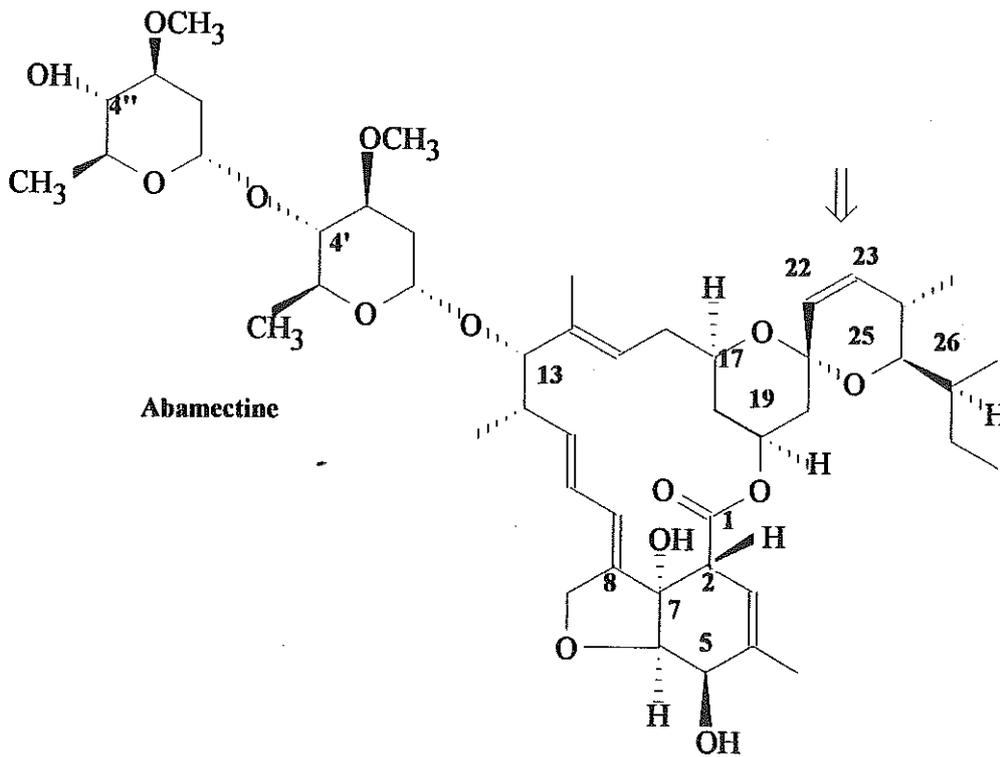
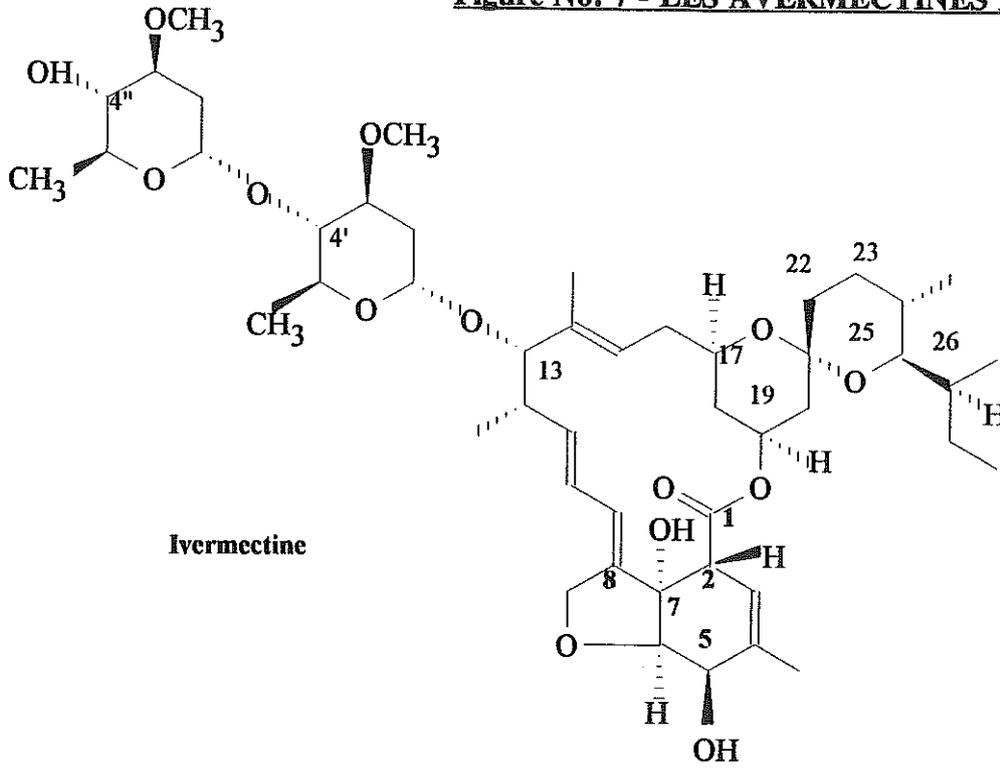
La fermentation de la bactérie actinomycète *Streptomyces avermitilis* produit 4 paires homologues de composés: avermectine A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, et B<sub>2</sub>. La nomenclature est la suivante: les composés A possèdent un groupement méthoxy en 5 et les composés B un substituant 5-hydroxy; les composés 1 montrent une double liaison en 22,23 dérivant de la déshydratation du groupement 23-hydroxy axial des composés 2. Les quatre paires sont en plus divisées en constituants majeurs A<sub>1a</sub>, A<sub>2a</sub>, B<sub>1a</sub>, B<sub>2a</sub>, (avec une chaîne latérale butyle secondaire au carbone 25) et en constituants mineurs A<sub>1b</sub>, A<sub>2b</sub>, B<sub>1b</sub>, B<sub>2b</sub>, toujours compris quantitativement entre 1% et 20%, (avec un substituant isopropyle sur le carbone 25). Trois de ces composés

(A<sub>2a</sub>, B<sub>1a</sub>, et B<sub>2a</sub>) sont produits en grandes quantités durant la fermentation. L'ivermectine B<sub>1a</sub> est le plus important car elle possède le plus large spectre antiparasitaire et fait office de matière première pour la semisynthèse des analogues en 22,23 dihydro, connus sous la dénomination d'Ivermectine. La séparation des composés majeurs en "a" et des composés mineurs en "b" étant impossible à grande échelle et l'activité pharmacologique des deux homologues étant identique, les composés commercialisés sont souvent le mélange de deux homologues telle l'Ivermectine ou 22,23-dihydroivermectine B<sub>1</sub>.

L'abamectine (MK-0936) (figure No. 7) est un produit de fermentation naturelle de *Streptomyces avermitilis* alors que l'ivermectine reste un dérivé de synthèse de l'abamectine. La structure chimique des deux produits diffère seulement sur la nature de la liaison entre les carbones 22 et 23 (double liaison pour l'abamectine et simple pour l'ivermectine).

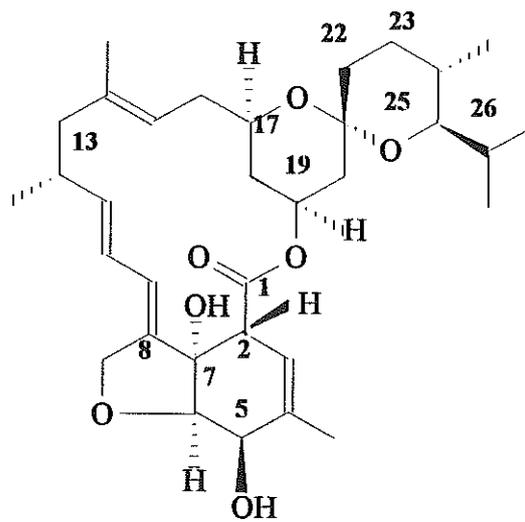
L'ivermectine (figure No. 7) est l'association de deux composés, B<sub>1a</sub>, B<sub>1b</sub>, (au moins 80% de 22, 23-dihydroivermectine B<sub>1a</sub> et pas plus de 20% de 22, 23-dihydroivermectine B<sub>1b</sub>) synthétisés par un champignon actinomycète : *Streptomyces avermitilis* MA-4680. Le poids moléculaire du composé B<sub>1a</sub> est de 874, et, celui du composé B<sub>1b</sub>, de 860.

**Figure No. 7 - LES AVERMECTINES ET LES MILBEMYCINES**

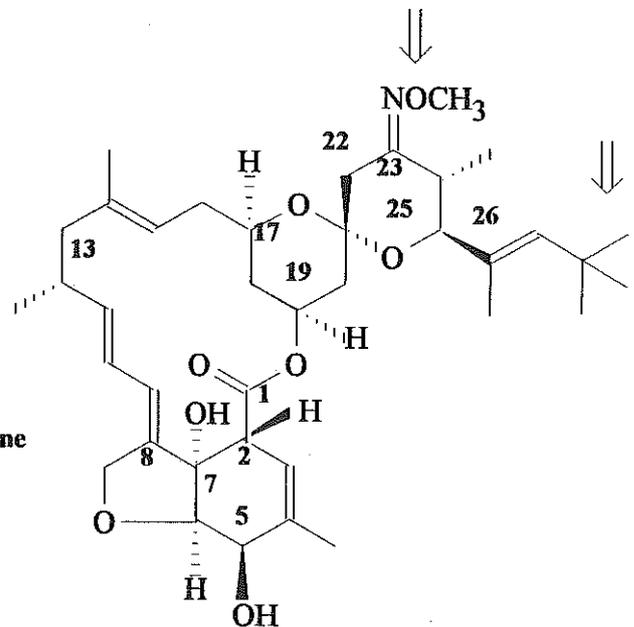


**Figure No. 8 - LES AVERMECTINES ET LES MILBEMYCINES (SUITE)**

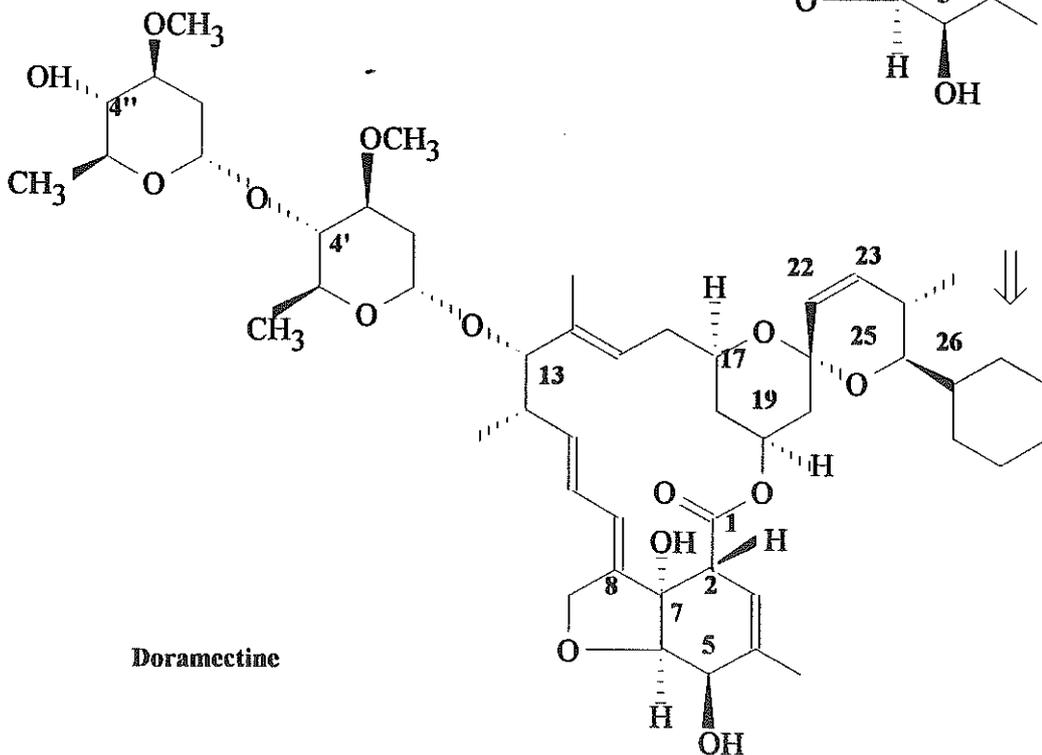
**Milbémycine B-41 D**



**Moxidectine**



**Doramectine**



## B) Propriétés chimiques et relation structure-activité :

Les avermectines sont des substances hautement lipophiles et se dissolvent bien dans de nombreux solvants organiques comme le chloroforme, le chlorure de méthylène, l'acétone, les alcools, le toluène, le cyclohexane, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde et le tétrahydrofurane. L'ivermectine en solution aqueuse se lie aux parois de verre ou plastique du contenant.

En général, les composés de la série B, possédant un groupement 5-hydroxy, sont plus actifs que ceux de la série A, contenant un groupement 5-méthoxy. Les séries 1 et 2 possèdent une activité similaire à l'égard de nombreux parasites mais la série 2 montre certaines lacunes la rendant moins intéressante comme, par exemple, l'inactivité de l'ivermectine B<sub>2</sub> à la dose de 0,1 mg/kg *per os* contre la forme adulte d'*H. contortus* chez le mouton. La réduction de la liaison 22,23 n'a que peu d'effet sur l'efficacité du produit mais confère une amélioration de la couverture du spectre et de la sûreté du produit expliquant l'utilisation commerciale de la 22,23-dihydroavermectine B<sub>1</sub>. Les monosaccharides d'ivermectine (perte d'un oléandrosyl par rapport aux disaccharides d'ivermectine) sont deux à quatre fois moins actifs que les disaccharides et l'aglycone de dihydroavermectine B<sub>1</sub> (perte sur le carbone 13 du substituant alpha-L-oléandrosyl-alpha-L-oléandrosyloxy) est trente fois moins efficace (Chabala *et al.*, 1980 ; *in* Campbell, 1989). Le groupement 5-hydroxy est essentiel pour une bonne activité antihelminthique comme le montre l'activité moindre des dérivés 5-méthoxy et 5-O-t-butylidiméthylsilyle [Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] (Mrozik *et al.*, 1982 ; *in* Campbell, 1989 sur *T. colubriformis* de gerbille). Les dérivés aromatiques de l'ivermectine B<sub>1</sub> sont dénués d'activité biologique (Fisher, 1985 ; *in* Campbell, 1989). Enfin, les relations structure-activité s'avèrent complexes lorsqu'elles portent sur différentes espèces. En effet, le monosaccharide de 22,23 dihydroavermectine B<sub>1</sub> est trois à quatre fois moins actif contre les helminthes que l'ivermectine B<sub>1</sub> mais reste seize fois plus actif contre la chenille de la leucanie (Mrozik *et al.*, 1985 ; *in* Campbell, 1989).

## C ) Métabolisme et pharmacocinétique :

L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion de l'ivermectine sont documentés chez les bovins, ovins, porcins, et rongeurs à l'aide de composés marqués au

tritium sur les carbones C<sub>5</sub> ou C<sub>22-23</sub>. L'ivermectine est rapidement absorbée que la voie d'administration soit orale, intraruminale, ou sous-cutanée, et la majorité du produit est éliminée, essentiellement sous forme inchangée, par les fèces, et, seulement 2% se retrouvent excrétés dans les urines. La distribution de la drogue est majoritaire dans le foie et les graisses, très peu élevée dans les tissus cérébraux (sites des neurones GABAergiques chez les mammifères), et similaire chez les quatre espèces pré-citées (par contre différente chez les porcins). Le métabolite majeur du foie chez les bovins, ovins, et rongeurs est la 24-hydroxyméthyl-dihydroavermectine B<sub>1a</sub> (polaire) qui est ensuite conjuguée en ester d'acides gras (non polaires) et précipitée dans les tissus graisseux. Les métabolites majeurs du foie chez les porcins sont la 3"-O-desméthyl-dihydroavermectine B<sub>1a</sub> et 3"-O-desméthyl-dihydroavermectine B<sub>1b</sub>; ces deux derniers composés étant aussi présents dans les tissus graisseux comme métabolites majeurs. La pharmacocinétique de l'ivermectine est influencée par de nombreux facteurs incluant par exemple l'espèce de l'animal traité, la formulation galénique et la voie d'administration. Ainsi, la formulation du produit dans un solvant non aqueux, comme le glycéraldéhyde-propylène glycol en injectable (IVOME<sup>®</sup>) pour les bovins, ovins et porcins, retarde son absorption sous-cutanée par rapport à une solution aqueuse, comme les micelles (Lo *et al.*, 1985 ; *in* Campbell, 1989). L'administration orale procure une moindre biodisponibilité, un pic plasmatique plus précoce et une demi-vie plus courte (Sutherland *et al.*, 1990 ; *in* Campbell, 1993). Chez le mouton, la demi-vie est semblable à celle des bovins (2.7 jours), mais, le volume de distribution est plus important. Chez le chien, l'ivermectine est éliminée plus rapidement que chez le mouton et la vache, avec une demi-vie, après injection intra-veineuse, de 1,8 jour. Lorsque la drogue est administrée au chien sous forme de tablettes, elle est rapidement absorbée en donnant un pic plasmatique en 2 à 4 heures. Chez le cheval, une formulation liquide orale donne un pic plasmatique en 4 à 5 heures, alors qu'une pâte orale forme son pic en 15 heures. Chez le porc, une forme orale donne un pic en 12 heures, et, comme chez la vache, une injection en sous-cutané se caractérise par une absorption plus faible (pic plasmatique de 2 jours) (Campbell, 1993).

#### Chez l'homme :

Une étude pharmacocinétique sur homme sain après l'administration d'une dose orale d'<sup>3</sup>H-ivermectine marquée en position C<sub>22</sub> et C<sub>23</sub> montre que le pic plasmatique de la

molécule mère apparaît quatre heures après la prise puis décroît lentement alors que le pic des métabolites marqués est deux fois plus important et plus tardif (sept heures). La phase d'élimination de l'ivermectine ne représente pas une décroissance exponentielle mais montre un second pic évoquant un cycle entéro-hépatique; la demi-vie est de dix à douze heures et l'ivermectine et ses métabolites semblent excrétés par la bile avec une excrétion urinaire minimale (<1%). Les métabolites les plus importants sont la 3"-O-desméthyl-22,23-dihydroavermectine B<sub>1a</sub> dans les urines et le monosaccharide de 22,23-dihydroavermectine B<sub>1a</sub> dans les fèces (Campbell *et al.*, 1989). La biodisponibilité de l'ivermectine en solution est plus importante que celle de la forme solide, mais, le degré de dissolution, plus que la forme galénique, semble déterminer l'absorption.

#### D) TOXICITE :

La toxicité aiguë de l'ivermectine chez les mammifères se manifeste par des effets sur le système nerveux central comme une ataxie, des tremblements, et, parfois, coma et mort. Les études de toxicité aiguë de l'ivermectine chez le rat, la souris, et les singes montrent des différences importantes entre espèces. Par exemple, une dose de 0,2 mg/kg chez la souris, ainsi qu'une dose légèrement supérieure chez le rat, entraîne les signes cliniques de la drogue (tremblements et ataxie), alors qu'elle ne provoque aucun effet indésirable sur de nombreuses autres espèces, incluant l'homme. De plus une étude chez le singe montre que la dose toxique minimum pour cette espèce est de 2,0 mg/kg, soit environ dix fois la dose clinique chez l'homme, impliquant une concentration plasmatique obtenue 5,5 fois plus rapidement que celle obtenue chez l'homme avec une dose de 0,2 mg/kg. Le fait qu'une overdose aiguë d'ivermectine, chez un enfant ayant absorbé oralement 8 mg/kg, entraîne des signes cliniques, semblables à ceux du singe, réversibles, indique que le singe, et non la souris, semble être le meilleur modèle d'étude de la toxicité chez l'homme. Les données de toxicité sur le développement avec l'ivermectine indiquent qu'elle n'est pas sélectivement toxique sur le développement de l'embryon et des effets secondaires ont peu de chances de se manifester aux doses non maternotoxiques. Chez le rat, et à des doses supérieures ou égales à 0,4 mg/kg/j, la concentration trois à quatre fois supérieure de l'ivermectine dans le lait maternel comparée avec celle du plasma induit une concentration importante de la drogue dans le cerveau et le plasma du nouveau-né allaité. La période d'hypersensibilité néonatale des rats

(10 jours) est contemporaine à la formation de la barrière hémato-méningée de cette espèce.

**\* Toxicité chez l'homme :**

L'ivermectine est utilisée chez l'homme par voie orale à des doses de 0,2 mg/kg dans le traitement de l'onchocercose sans effet secondaire important (Greene *et al.*, 1985 ; in Campbell, 1989) alors que sur la souris la même dose déclenche de graves signes de toxicité et parfois la mort de certaines (Campbell *et al.*, 1989). Toutefois, il a été décrit, chez l'homme, certains effets indésirables qui sont, dans la plupart des cas, légers et transitoires:

- 1 - Réaction d'hypersensibilité résultant de la lyse des microfilaires après traitement (réactions de type Mazzotti, rarement sévères) : prurit, conjonctivite, arthralgies, myalgies, fièvre, oedème, lymphadénite, adénopathies, nausées, vomissements, diarrhées, hypotension orthostatique, tachycardie, asthénie, éruption et céphalées.

- 2 - Manifestations ophtalmologiques, elles aussi peu fréquentes: sensations anormales dans les yeux, oedème de la paupière, uvéite antérieure, conjonctivite, limbite, kératite et chorioretinite ou choroïdite dont les causes sont liées au parasite mais se manifestant durant le traitement.

- 3 - Somnolence et modifications transitoires non spécifiques de l'électro-encéphalogramme.

- 4 - Eosinophilie transitoire et transaminases élevées (SGPT).

**\* Grossesse :**

Chez la femme enceinte, la prescription d'ivermectine n'est pas recommandée:

- L'administration d'ivermectine, en prises répétées, à des doses voisines ou égales aux doses maternotoxiques, entraîne des malformations foetales chez la souris (NEL : No-Effect Level > 0,8 mg/kg), le rat (NEL > 10,0 mg/kg), chez le lapin (NEL > 1,5 mg/kg), ainsi qu'une toxicité sur le développement (Campbell *et al.*, 1989).

- Il est difficile d'apprécier à partir de ces études la toxicité réelle d'une prise unique à faible dose mais il est souvent possible de différer le traitement de quelques mois.

**\* Allaitement :**

Moins de 2% de la dose administrée apparaissent dans le lait maternel, mais la sécurité d'emploi n'a pas été établie chez les nouveau-nés.

En conclusion l'ivermectine ne sera donnée aux mères allaitantes que si le bénéfice

attendu est supérieur au risque potentiel encouru par le nouveau-né et le traitement des mères voulant nourrir leur enfant ne sera débuté que trois mois après la naissance de l'enfant.

**\* Surdosage :**

Au cours de surdosages accidentels, les symptômes sont similaires à ceux décrits en toxicologie aiguë animale, à type de mydriase, somnolence, ataxie et tremblements (TEL : Toxic Effect Level de 6,6 à 8,6 mg/kg ; dose thérapeutique chez l'homme : 0,2 mg/kg).

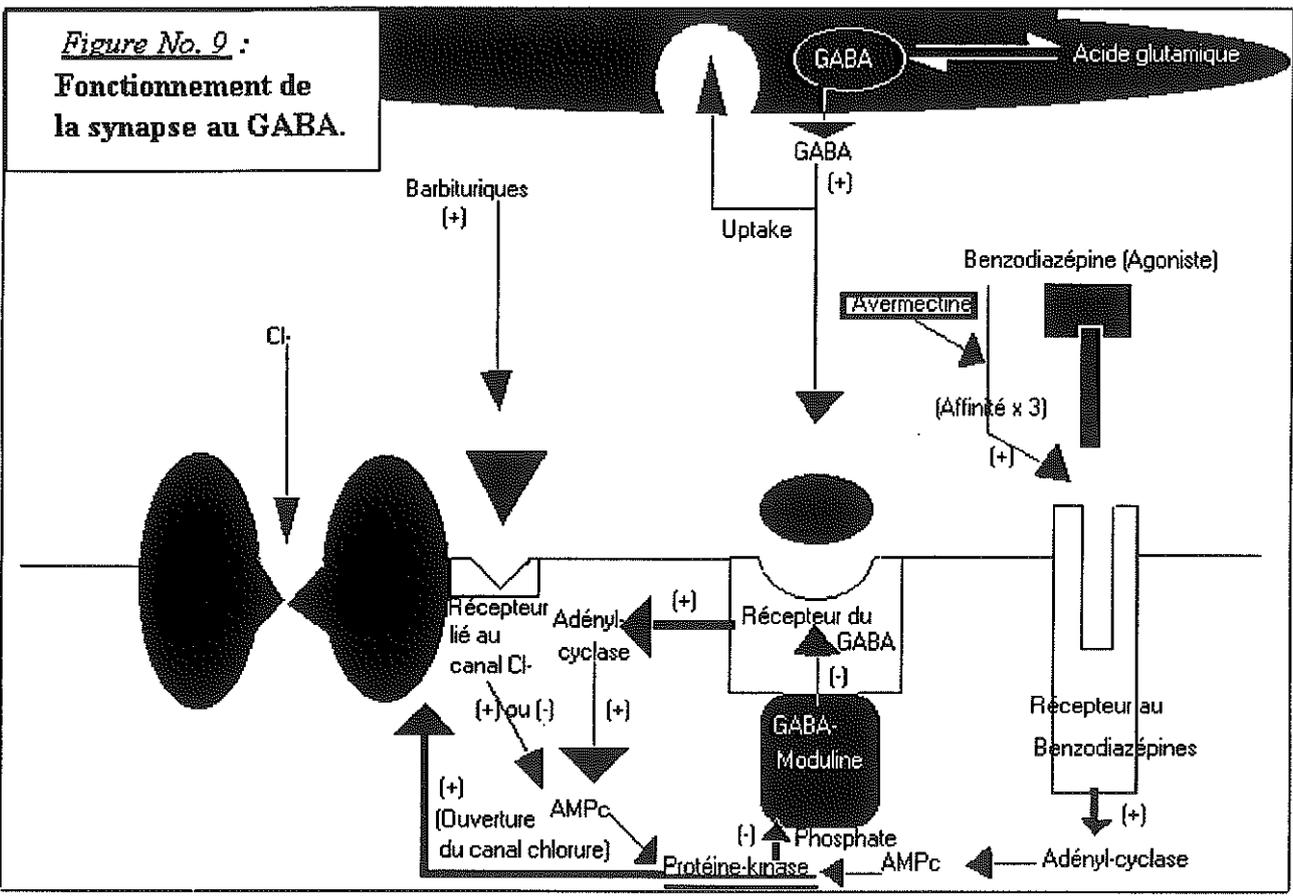
**E) MODE D'ACTION DE L'IVERMECTINE :**

L'ivermectine semble stimuler la libération du neurotransmetteur inhibiteur, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) à partir des terminaisons nerveuses présynaptiques; il en résulte, chez les Nématodes, une inhibition de la transmission des influx allant des interneurons du cordon ventral aux neurones moteurs (figure No. 9). Chez les Arthropodes, un mécanisme identique inhibe la transmission des influx à la jonction neuromusculaire. Enfin, chez les mammifères, la barrière hémato-méningée empêche pratiquement toute pénétration d'ivermectine dans le système nerveux central, dépositaire des neurones GABAergiques. L'activité antihelminthique fut décrite pour la première fois en 1979 (Burg *et al.*, 1979 ; Egerton *et al.*, 1979 ; Miller *et al.*, 1979 ; in Campbell, 1989 ) mais son mode d'action reste complexe car étudié sur différents modèles avec des résultats variés. Ainsi une injection directe chez *A. suum* donne une paralysie qui n'est ni flasque ni rigide alors que la même drogue, chez *C. elegans*, provoque une paralysie rigide lente à se manifester, et est sans effet sur *H. contortus ex vivo*. Les raisons de ces différences d'action restent inconnues mais semblent liées au fait que :

- 1 - la drogue semble agir en de multiples sites d'action,
- 2 - les différentes espèces cibles présentent une sensibilité variée à la drogue,
- 3 -les avermectines sont caractérisées par une faible solubilité dans les milieux aqueux.

L'action sur les systèmes vertébrés et invertébrés est distincte et il semble logique de les étudier séparément.

**Figure No. 9 :**  
**Fonctionnement de**  
**la synapse au GABA.**



## E-1) Chez les Invertébrés :

### E-1-1) Etudes électrophysiologiques :

D'après les études de Fritz *et al.*, en 1979 (*in* Campbell, 1989), sur un muscle extenseur de homard perfusé avec  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M d'ivermectine, les potentiels inhibiteurs post-synaptiques sont rapidement éliminés, suivis par une réduction progressive dans l'amplitude des potentiels excitateurs post-synaptiques. Dans cette préparation l'ivermectine réduit la résistance au déclenchement de la fibre musculaire en augmentant sa perméabilité aux ions chlorures. La picrotoxine (un antagoniste GABA actif sur les canaux chlorures) lève les effets de l'ivermectine (réduction des potentiels excitateurs et résistance au déclenchement) et confirme donc que la réponse aux avermectines se manifeste par une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions chlorures. Cette dernière manifestation est due, soit à une interaction avec des sites liant le GABA, soit à travers une libération de GABA endogène (thèses confirmées ensuite par Mellin *et al.*, 1983 et Albert *et al.*, 1986 ; *in* Campbell, 1989).

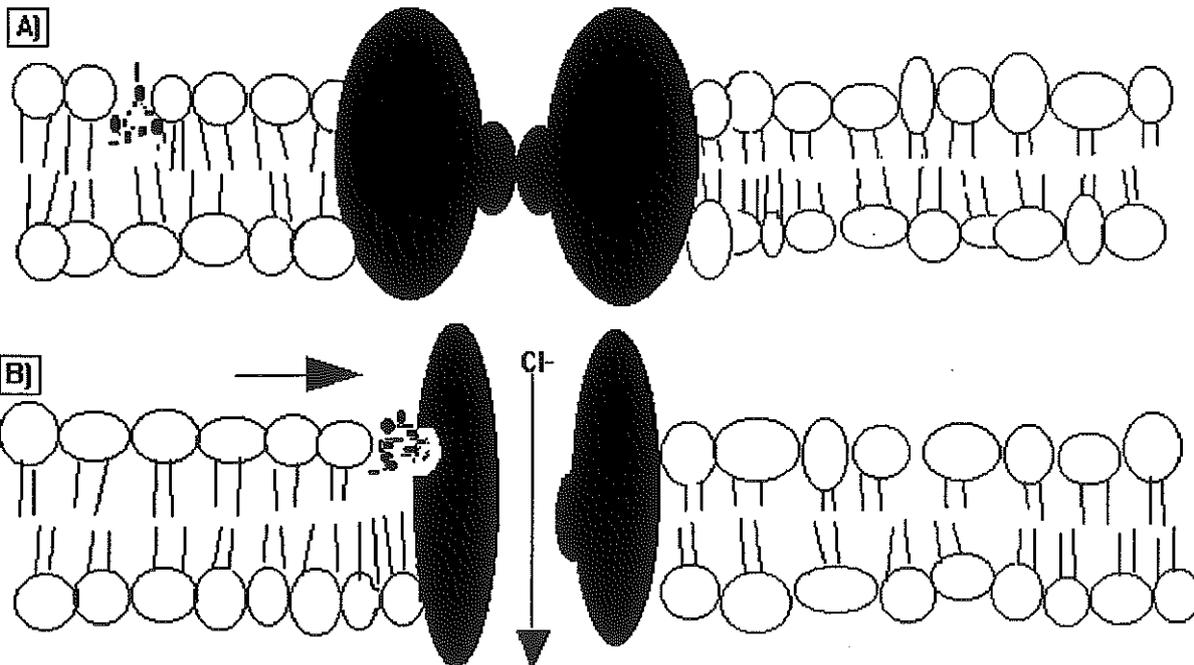
Kass *et al.* en 1980 et 1984 (*in* Campbell, 1989) sur motoneurones d' *A. lumbricoides* perfusés avec  $5 \times 10^{-6}$  M remarquent une inhibition de la transmission entre interneurones et motoneurones excitateurs du cordon nerveux ventral de l'helminthe ainsi qu'entre les motoneurones inhibiteurs et le muscle ; de plus, ils remarquent un léger effet sur la transmission neuromusculaire excitatrice. La picrotoxine antagonise toujours le blocage de la transmission interneurones-motoneurones excitateurs induit par l'ivermectine mais reste sans effet sur la synapse des motoneurones inhibiteurs en présence ou absence d'ivermectine. Cette étude semble indiquer que les ivermectines se comportent, soit, comme agonistes GABA, soit, comme stimulateurs de libération GABAergique des terminaux présynaptiques inhibiteurs.

Duce et Scott en 1983 et 1985 (*in* Campbell, 1989), sur muscle extenseur du tibia d'un criquet (*Schistocerca gregaria*) montrent que certains faisceaux musculaires sont sensibles au GABA alors que d'autres, recevant seulement une innervation inhibitrice, sont insensibles au GABA. Cette remarque fut exploitée pour comprendre la relation entre les ivermectines et le complexe récepteur GABA-ionophore du muscle de l'insecte. Un faisceau musculaire GABA-sensible, recevant une innervation inhibitrice, montra, à la fois, une

réponse réversible et irréversible aux avermectines. On observe alors une augmentation réversible, dose-dépendante, de la perméabilité aux chlorures avec de faibles doses d'ivermectine ( $10^{-10}$  M); ceci s'expliquant par une interaction de l'ivermectine avec un complexe récepteur GABA-canal chlorures. Des doses plus importantes ( $10^{-8}$  M) provoquent une augmentation irréversible de la conductance aux chlorures, même après un arrêt du traitement à l'ivermectine. Enfin, des neurones GABA-insensibles sous innervation non inhibitrice, soumis à de doses d'ivermectine de  $10^{-10}$  M, montrent une augmentation irréversible de la conductance aux chlorures. Ces résultats semblent donner un site d'action des avermectines distinct du complexe récepteur GABA-canal chlorure. Martin et Pennington en 1988 (*in* Campbell, 1989) sur membrane musculaire d'*A. suum* avec une dose d'ivermectine de  $2 \times 10^{-12}$  M observent une ouverture en palier des canaux chlorures avec un délai concentration-dépendant au départ. L'amplitude du canal est de 1 pA, la conductance de 12 pS, la durée d'ouverture est très longue ( $> 1$  seconde) et irréversible. Ce canal chlorure n'est ni voltage-dépendant, ni ouvert par le GABA, ni sensible à d'autres neurotransmetteurs examinés. En utilisant le même type de préparation (techniques de "patch-clamping"), des canaux ouverts par le GABA produisent une durée d'ouverture de 35 msec, avec une conductance de 22 pS et une action des avermectines sur ces canaux n'est visible qu'à des concentrations  $> 10^{-8}$  M (à de telles doses, effet antagoniste GABA). Les effets des avermectines sur les canaux GABA dépendants ont été étudiés par des techniques de "current-clamp" (Holden-Dye et Walker, 1990 ; *in* Martin *et al.*, 1992) et "patch-clamp" (Martin et Pennington, 1989 ; *in* Martin *et al.*, 1992). Les rapports dose-réponse du GABA sont minorés de manière non-compétitive par les avermectines. Il semble que l'action GABA-antagoniste soit actuellement le plus crédible mode d'action sur le muscle d'*Ascaris*. Martin et Pennington en 1989 (*in* Martin *et al.*, 1992) montrent que les avermectines provoquent une réduction dose-dépendante de la conductance aux chlorures ainsi qu'une réduction dose-dépendante de la fréquence d'ouverture des canaux. La distribution des Avermectines fut ensuite étudiée avec un dérivé fluorescent de l'ivermectine, l'ivermectine conjuguée, en utilisant un bain au bleu trypan et la FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). L'expérimentation montra que les sondes fluorescentes ne migraient pas et ne "flicflaquaient" pas à travers la membrane et que la diffusion latérale était de  $14 \times 10^{-10}$   $\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ . La lente diffusion latérale fut proposée pour expliquer le délai entre l'application d'ivermectine et l'ouverture des canaux et un modèle de mode d'action fut présenté (figure No. 10).

**Figure No. 10 : Modèle de l'action des avermectines.**

A) Les molécules d'ivermectines peuvent diffuser dans la monocouche extérieure, latéralement mais pas verticalement. B) Ces molécules se combinent avec un canal aux chlorures par un site ouvert, localisé dans cette monocouche extérieure. (D'après Martin et al., 1992)



L'ivermectine agirait sur un canal chlore, présent, dans les tissus des espèces cibles, dans la phase lipidique de la monocouche externe de la membrane. Martin et Pennington en 1989 décrivent l'ouverture d'un canal chlorure non GABA-activé, après dix secondes, après application de 22,23 dihydroavermectine B<sub>1a</sub> sur la surface externe de fragments membranaires de muscles d'*Ascaris*. Malgré la nature lipophile de la 22,23 dihydroivermectine B<sub>1a</sub>, cette action non symétrique semble explicable, si, le mouvement de la molécule entre les deux couches phospholipidiques de la membrane est limité comme les phospholipides. En effet l'ivermectine conjuguée ne traverse pas la couche interne phospholipidique et ne fonctionne donc pas comme un ionophore. Ce comportement semble indiquer que le groupement lactone macrocyclique/spiroacetal réagit avec un site sur le canal chlorure alors que le groupement disaccharide oléandrosyl reste dans la phase aqueuse. Ce schéma montre que les tissus et les membranes surjacentes peuvent protéger l'accès aux sites actifs. Le diméthyl sulphoxide est utilisé couramment pour solubiliser les avermectines et une concentration suffisante agirait donc comme "promoteur de pénétration" facilitant le mouvement de grosses molécules à travers la membrane, en augmentant la fluidité membranaire. Ainsi les effets ralentisseurs, des membranes surjacentes et de diffusion verticale à travers la monocouche supérieure, sont réduits par le diméthyl sulphoxide. Les animaux montrant une sensibilité particulière aux avermectines, possèdent des canaux chlorures membranaires dans lesquels les avermectines sont plus solubles (Martin *et al.*, 1992). Une étude récente, où le chlore était remplacé par NO<sub>3</sub> et l'enregistrement se faisant sur les potentiels moyens de membranes de la région "sac" de plusieurs muscles, montre que de fortes concentrations d'ivermectine produisent une hyperpolarisation moyenne de 3 mV après une période d'une heure. Martin *et al.*, en 1992, s'intéressent à la distribution de sondes fluorescentes dans les membranes d'*Ascaris*. Cette étude est développée sur des vésicules de membranes musculaires, incubées dans des concentrations d'ivermectine supérieures à 1 ng/ml, et montre une fluorescence dose-dépendante des vésicules. L'intensité de la fluorescence n'est pas atténuée (mais plutôt augmentée) par une incubation préalable avec de l'ivermectine non marquée. Cette observation semble prouver que la majorité de l'ivermectine conjuguée est libre et non associée à un récepteur, dans la phase lipidique membranaire.

Arena *et al.*, en 1991 (*in* Arena *et al.*, 1992), montrent que l'ARN poly(A)<sup>+</sup> de *C. elegans* injecté dans des oocytes de *Xenopus* code pour un canal chlorures activé par les

avermectines. En effet, la petite taille de *C. elegans* à longterm empêche toute étude électrophysiologique sur ce parasite et la connaissance des mécanismes intimes électrophysiologiques était issue de l'étude sur *A. suum*, aux connexions synaptiques similaires. Pour approcher la neurophysiologie de *C. elegans*, Arena utilisa le système biologique d'amplification que représentaient les oocytes de *Xenopus laevis*, pour exprimer l'ARN poly(A)<sup>+</sup> de *C. elegans*. Ces courants avermectines-sensibles sont bloqués par la picrotoxine (un bloqueur de canaux chlorures ligand-ouverts) mais, insensibles au GABA, muscinol et bicuculline. De plus, les avermectines semblent activer la conductance aux chlorures glutamate-sensibles sur le muscle de criquet *S. gregaria* (Duce et Scott, 1985 ; 1985 ; in Arena *et al.*, 1992), ainsi que les canaux chlorures multi-transmetteurs (glutamate, acétylcholine, GABA) sur le muscle de l'estomac de langoustes (Zufall *et al.*, 1989 ; in Arena *et al.*, 1992).

Arena dans une étude récente (1992) montre que des oocytes de *Xenopus* injectés d'ARN poly(A)<sup>+</sup> de *C. elegans* expriment un courant chlorure glutamate-sensible directement activé par les avermectines. De basses concentrations en avermectines potentialisent la réponse au glutamate. Dans de tels oocytes, le glutamate active un courant membranaire vers l'intérieur qui désensibilise en présence continue de glutamate. Les agonistes au récepteur du glutamate, tels que le quisqualate, le kainate et le N-méthyl-D-aspartate sont inactifs. Le potentiel réverse du courant glutamate-sensible est de -22 mV, et montre une grande dépendance envers la concentration extracellulaire en chlorures (avec une variation de 48 mV pour une concentration en chlorures multipliée par dix). Les bloqueurs non-sélectifs des canaux chlorures, comme le flufenamate, ainsi que les bloqueurs des canaux chlorures ligand-ouverts, comme la picrotoxine, inhibent ce courant glutamate-sensible. L'ibobénate, un analogue structural du glutamate, active aussi le courant chlorure glutamate-sensible, mais reste inactif quand le courant est partiellement désensibilisé avec le glutamate. Les réponses aux basses concentrations d'ibobénate et de glutamate sont additives. Les avermectines augmentent la réponse à des concentrations en glutamate sous-maximales, déplacent la courbe concentration- réponse à de basses concentrations et ralentissent la désensibilisation du courant glutamate-sensible. Ces résultats confirment que l'action antihelminthique des avermectines semble modulée par un canal chlorure glutamate-ouvert.

### E-1-2) Les sites de liaison de l'ivermectine :

Des sites de liaison spécifiques à l'ivermectine, ont été isolés par Schaeffer et Haines, en 1989 (*in Rohrer et al.*, 1992) sur membranes de *C. elegans*. La liaison spécifique est saturable et la constante apparente de dissociation est de  $2,6 \times 10^{-10}$  M. Une analyse cinétique montre que la réaction se produit en deux paliers. Premièrement, un complexe rapidement réversible se forme, puis, après une incubation supplémentaire, un deuxième complexe plus lentement réversible se forme. Les analogues structuraux qui possèdent la plus forte affinité pour les sites liant l'ivermectine, sont ceux qui exercent le plus important pouvoir antihelminthique. Les sites spécifiques de l'ivermectine identifiés dans le cerveau de rat montre une affinité cent fois plus faible que ceux trouvés chez *C. elegans*. Chez ce dernier parasite, il fut découvert également des sites de liaison GABA spécifiques de haute affinité ( $K_D = 3,7 \times 10^{-8}$  M), sur lesquels des concentrations d'ivermectine de  $10^{-10}$  à  $10^{-6}$  M n'ont aucun effet sur la liaison de GABA marquée au tritium (*in Campbell*, 1989).

Lummis et Sattelle, en 1985 (*in Campbell*, 1989), sur cordon nerveux de blatte (*P. americana*), identifient un site liant le GABA ( $K_D = 3,84 \times 10^{-7}$  M). L'ivermectine augmente le niveau de fixation du GABA tritié à des concentrations restreintes de  $0,5$  à  $5,0 \times 10^{-6}$  M. Aucun effet n'est alors remarqué à des concentrations supérieures ou inférieures.

Abalis et Eldefrawi en 1986 (*in Campbell*, 1989) sur des membranes d'abeilles montrent que l'ivermectine agirait comme agoniste partiel des sites liant le GABA et entrerait en compétition avec le muscinol tritié pour se lier spécifiquement aux membranes.

### E-1-3) Captage des chlorures :

Tanaka et Matsumura en 1985 (*in Campbell*, 1989) sur un muscle de patte de blatte (*P. americana*) observent l'action stimulante sur le captage des chlorures de l'ivermectine à basse concentration ( $10^{-8}$  M). Ce captage ivermectine-stimulé est antagonisé par la picrotoxine et, pour une moindre part, par le méthiodure de bicuculline. Enfin, à une concentration de  $10^{-7}$  M, les muscles de la patte ne répondent plus à un stimulus externe et cette inhibition semblerait due à une augmentation du captage des chlorures par les muscles. Puisque l'ivermectine ne présente pas d'effets stimulateurs sur la fixation, du muscinol et de

la dihydropicrotoxine, aux membranes musculaires, les auteurs en déduisent que l'ivermectine n'est pas active sur les sites liant le GABA, mais, directement, sur un site lié au canal chlorures.

#### E-1-4) Libération d'acétylcholine :

Nicholson *et al.*, en 1988 (*in* Campbell, 1989), sur une préparation de synaptosomes du système nerveux central de blatte, mesurent la libération présynaptique ivermectine-induite d'acétylcholine tritiée, et, remarquent que l'ivermectine est bien responsable d'une libération de radioactivité présumée être de l'acétylcholine. Le seuil de déclenchement de la libération d'acétylcholine est de  $10^{-10}$  M d'ivermectine, et, la stimulation maximum est obtenue avec  $10^{-6}$  M. Cet effet est chlorure dépendant, et peut être antagonisé par la picrotoxine et l'hexachlorocyclohexane (alors que l'isomère  $\beta$  de l'hexachlorocyclohexane potentialise l'effet de l'ivermectine).

En conclusion, chez l'insecte, l'ivermectine induit l'ouverture de canaux chlorures présynaptiques et non GABA dépendants, conduisant à un flux d'ions chlorures, à une dépolarisation du nerf terminal, et, libérant le neurotransmetteur.

#### **E-1-5) Interaction avec les protéines liant le rétinol :**

Sani et Vaid en 1988 sur différentes espèces de la famille des *Onchocercidae* (*Onchocerca volvulus*, *O. gibsoni*, *Dirofilaria immitis*, *Brugia pahangi*), et sur *S. mansoni* montrent que l'ivermectine se lie à une protéine liant le rétinol du parasite (Parasite Retinol-Binding Protéine = PRBP). La compétition entre l'ivermectine et le rétinol est étrange, car les deux molécules ne présentent que peu de similarité dans leur structure chimique. Le rétinol est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires dont la différenciation et la maintenance des tissus épithéliaux, les processus de croissance, de reproduction et de vision. L'action du rétinol et de l'acide rétinoïque est supportée par une protéine cellulaire liant, soit le rétinol (CRBP), soit l'acide rétinoïque (CRABP). Ces protéines liantes entraînent le processus biologique qui détermine la migration des rétinoïdes, de la surface membranaire jusqu'au noyau, où ils exercent leurs effets spécifiques sur les gènes. Mais le parasite perdant sa fonction de vision, le rétinol semble être utilisé pour le reste des rôles biologiques de la vitamine A. De plus, la croissance de différents stades de développement chez l'helminthe semble liée à la concentration de rétinol chez l'hôte (Mahalanabis *et al.*, 1976 ; *in* Sani et Vaid, 1988), et la concentration en rétinol chez l'adulte d'*O. volvulus* est huit fois supérieure à celle entourant les tissus de l'hôte (Sturchler *et al.*, 1983 ; *in* Sani et Vaid, 1988). Cependant, l'ivermectine ne présente aucune affinité à la fois pour la protéine liant le rétinol (PRBP) de l'hôte, et pour la protéine liant l'acide rétinoïque (PRABP), de l'hôte et du parasite. Des études utilisant une ivermectine et un rétinol marqués montrent que l'ivermectine possède une plus forte affinité pour la PRBP que le rétinol et une corrélation existe entre l'affinité de liaison des analogues de l'ivermectine et leur pouvoir antihelminthique. Ces expériences prouvent donc la présence d'une protéine liante, médiant la relation entre l'ivermectine et le rétinol, chez le parasite, mais pas chez l'hôte.

#### **E-1-6) Inhibition de la synthèse de chitine :**

Calcott et Fatig en 1984 ont montrés que l'avermectine inhibe la croissance fongique (*Mucor miehei*) en interférant avec le métabolisme de la chitine. Ces résultats furent obtenus avec un extrait méthanolique d'une culture de *S. avermitilis*. L'extrait inhibait l'incorporation de la N-acétylglucosamine dans la chitine, réduisait le turn-over de la chitine chez la crevette

de mer (*Artemisia salina*), et inhibait la chitinase purifiée de *Streptomyces antibioticus*. Ces résultats ne furent pas confirmés en utilisant une avermectine purifiée (Onishi et Miller, 1985; *in* Campbell, 1989) et il fut tardivement démontré que l'activité antifongique semblait liée à l'oligomycine et un polyène contenus dans l'extrait (Gordnier *et al.*, 1987 ; *in* Campbell, 1989).

## E-2) Les Vertébrés :

Les avermectines sont des molécules particulièrement intéressantes, par leur capacité à tuer le parasite sans atteindre l'organisme de l'hôte. De nombreuses études décrivent les effets des avermectines sur les Vertébrés à des concentrations très importantes en comparaison avec celles utilisées sur l'organisme cible ; pour cette raison les effets des avermectines sur les espèces vertébrées ne sont pas forcément compatibles avec les mécanismes décrits chez les Invertébrés.

### E-2-1) Les avermectines stimulent la libération de neurotransmetteurs :

Pong *et al.* en 1980 (*in* Campbell, 1989), observent que les avermectines ( $2 \times 10^{-6}$  M) entraînent la libération de GABA endogène du cortex cérébral de rat. Le glutamate, par contre, n'est pas libéré, ce qui démontre une certaine spécificité de la réponse.

Ishiko *et al.*, en 1985 (*in* Campbell, 1989), sur un fragment de la région du noyau caudé cérébral du rat montrent un effet inhibiteur des avermectines ( $10^{-3}$  à  $10^{-2}$  M), sur la libération calcium -dépendante, potassium-stimulée de dopamine (effet antagonisé par  $10^{-5}$  M de picrotoxine et  $10^{-4}$  M de bicuculline). Ces expérimentations, utilisant des concentrations d'avermectines largement supérieures aux doses pharmacologiques, ne présentent pas d'intérêt dans la compréhension des mécanismes d'action chez les espèces cibles.

### E-2-2) Sites liant les avermectines :

Un site spécifique liant les avermectines fut décrit sur des synaptosomes cérébraux de chien ( $K_D = 1,2 \times 10^{-9}$  M) (Pong et Wang, 1982 ; *in* Campbell, 1989). Cette liaison de haute affinité était saturable et la densité des sites de liaison estimée à 1,54 pmol/mg de

protéine. Les études de compétition montrèrent une liaison stéréospécifique et une affinité pour les sites de liaison corrélée à l'activité antihelminthique. Ces sites étaient inégalement répartis dans le cerveau canin, la plus forte densité se trouvant dans le cervelet (région la plus riche en sites de liaison du GABA). De tels sites furent aussi décrits sur le cerveau du rat (Drexler et Sieghart, 1984 ; *in* Campbell, 1989). Mais la liaison des avermectines sur ces sites semblait inhibée en présence de GABA. D'autres agonistes GABA eurent de mêmes effets et ils purent être bloqués par les antagonistes du GABA ainsi que les ions chlorures. La présence d'ion chlorures dans la solution d'incubation peut expliquer pourquoi Pong *et al.* n'observèrent aucun effet du GABA sur la liaison des avermectines.

La liaison spécifique de haute affinité des avermectines tritiées est augmentée par les convulsivants comme la picrotoxine, inhibée par les anticonvulsivants comme le pentobarbital et les anxiolytiques comme l'étazolate. Ces résultats montrent une interaction entre le site de liaison des avermectines et le complexe {[récepteur GABA-benzodiazépine]-[canal chlorure]}.

#### E-2-3) Les effets des avermectines sur la liaison du GABA tritié :

Pong et Wang, en 1982 (*in* Campbell, 1989), ont montré que les avermectines stimulent la liaison du GABA tritié sur des membranes lavées de cerveau de rat. Les avermectines semblent ne pas changer l'affinité du GABA pour ses sites mais plutôt augmenter le nombre de sites de liaison de 60%. Cet effet est antagonisé par la bicuculline et la picrotoxine, et, est chlorure dépendant. Cependant, Olsen et Snowman, en 1985 (*in* Campbell, 1989), signalent que les avermectines ( $10^{-7}$  M) baissent la liaison du GABA sur des membranes cérébrales de rat (-50%) et augmentent la liaison d'antagonistes GABA comme la bicuculline. Ces derniers résultats sont en complète contradiction avec ceux de Pong *et al.*, 1982, et les raisons de cette différence sont inconnues.

Calcott et Fatig, en 1984 (*in* Campbell, 1989), affirment que les avermectines augmentent la fixation de GABA tritié sur des membranes cérébrales de rat ; la stimulation maximale est alors de 50% en présence de  $4 \times 10^{-7}$  M d'avermectines.

#### E-2-4) Les effets des avermectines sur les sites de liaison des benzodiazépines:

Les agonistes des benzodiazépines augmentent l'affinité des sites de reconnaissance du GABA associé au complexe [récepteur GABA/canal chlorure], (figure No. 11), (Guidotti

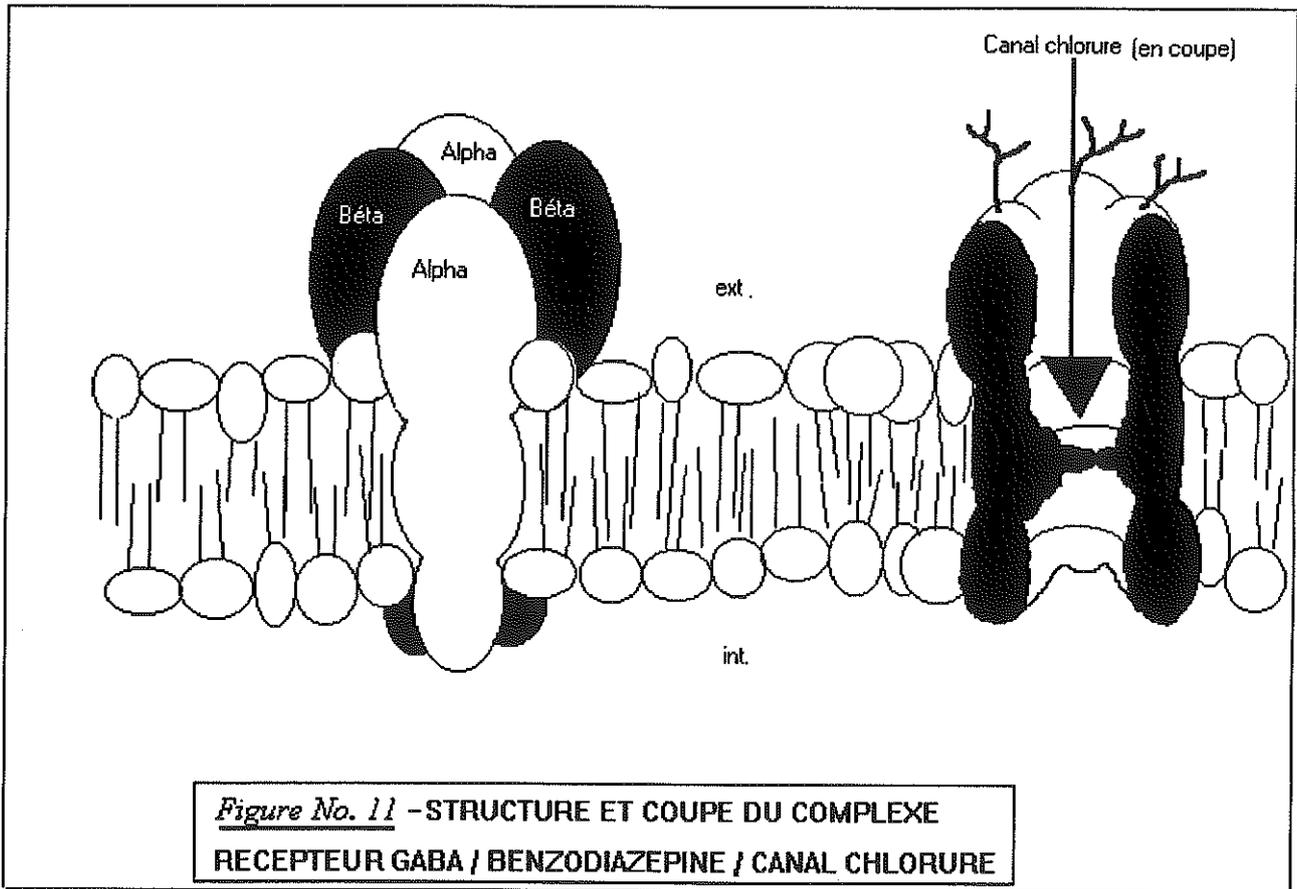
*et al.*, 1978 ; *in* Campbell, 1989). Les avermectines potentialisent la liaison des benzodiazépines sur le récepteur des membranes de rat, souris, et homme (Williams et Yarbrough, 1979 ; Paul *et al.*, 1980 ; Williams et Risley, 1984 ; *in* Campbell, 1989). Ces études montrent clairement que les avermectines (de 40 à 250 x 10<sup>-9</sup> M) provoquent une augmentation (de 15% à 100%), concentration-dépendante, de la liaison, *in vitro*, des benzodiazépines tritiées aux membranes. Les avermectines provoquent, à la fois, une augmentation de l'affinité et du nombre de sites de liaison pour les benzodiazépines tritiées.

#### E-2-5) Capture des chlorures :

Le GABA stimule l'entrée des chlorures dans les tissus des neurones. Soderlaud *et al.*, en 1987 (*in* Campbell, 1989), montrent que les avermectines sont de faibles activateurs de la capture des chlorures en absence de GABA, de même que des inhibiteurs de la capture des chlorures GABA-stimulée, sur des synaptosomes de rat. Cependant, lorsque les auteurs utilisent du tissu cérébral de souris, les avermectines se comportent comme un antagoniste non-compétitif de la capture GABA stimulée. Les auteurs concluent que les avermectines se lient avec une haute affinité en un site associé, mais non identique, au récepteur GABA. Ces différences observées entre souris et rat sont difficiles à expliquer et, de plus, il apparaît une incompréhension dans le fait que les avermectines, dans d'autres systèmes, augmentent la perméabilité membranaire aux ions chlorures, et agissent ainsi en agoniste GABA (et pas en antagoniste).

Schaeffer et Haines, en 1989 (*in* Campbell, 1989), ont montré que le GABA (3 x 10<sup>-4</sup> M) augmente la capture des chlorures dans les neurosynaptosomes du cortex cérébral de rat (+125%). Les avermectines n'auraient aucun effet sur l'entrée de chlorures, mais semblent, cependant, potentialiser l'entrée de chlorure GABA-stimulée, sans augmenter la réponse maximale au GABA.

Sigel et Baur en 1987 (*in* Campbell, 1989) injectent un ARNm de cerveau de poulet dans un oocyte de *Xenopus* et remarquent l'expression d'un récepteur GABA fonctionnel. Une technique de "voltage-clamp" est mise en place sur l'oocyte, et les effets de composés divers sur le courant chlorure GABA-induit sont enregistrés. Les avermectines augmentent fortement le courant chlorure GABA-induit (augmentation : dose-dépendante). Les avermectines ne semblent affecter ni le potentiel réverse du courant, ni la réponse maximale provoquée par le GABA, ni la perméabilité membranaire en absence de GABA.



### **E-2-6) Autres actions des avermectines:**

Graham *et al.*, en 1982 (*in* Campbell, 1989), identifient et caractérisent un site liant la glycine associée à des membranes du cordon médullaire de rat. Les avermectines semblent inhiber la liaison de la strychnine (antagoniste de la glycine). Les fortes concentrations utilisées pour cette expérience, impliquent que cette action n'a pas d'importance physiologique.

Ellis *et al.*, en 1987 (*in* Campbell, 1989), montrent une activité inhibitrice spécifique (-50%), des avermectines ( $10^{-6}$  M), sur la protéine kinase C de cerveau de rat. Mais, les fortes doses employées, sont, là encore, dépourvues d'intérêt.

### **E-3) Conclusion sur les mécanismes d'action des ivermectines :**

Le mode d'action des ivermectines ne peut se résumer à un seul mécanisme. Mais sur les espèces cibles, l'action des avermectines se caractérise par la fixation sur un site de liaison de haute affinité ( $10^{-10}$  M). La réponse physiologique à cette interaction, se manifeste par une augmentation de la perméabilité membranaire aux ions chlorures, par un canal chlorure indépendant du GABA. Les canaux chlorures GABA-ouverts peuvent aussi réagir avec les avermectines, mais à des concentrations significativement plus fortes ( $10^{-7}$  M). D'autres modes d'action complétant ce dernier, ont été proposés, mais ils restent à confirmer.

## **F) RESISTANCE AUX IVERMECTINES :**

### **F-1) Historique et répartition :**

Introduite en 1984 (Campbell *et al.*) pour le contrôle des nématodes et en 1989 (*in* Jackson *et al.*, 1991), pour les Arthropodes, l'ivermectine s'est vite imposée comme un antiparasitaire à large spectre.

### **In vitro :**

La résistance à l'ivermectine, bien que nouvellement introduite sur le marché, est décrite, *in vitro*, sur *H. contortus* chez le mouton (8 générations pour produire une résistance). Le passage de 11 générations par cet isolat résistant, sans pression thérapeutique, ne provoque pas de réversion de la sensibilité, prouvant par là même que la résistance à

l'ivermectine est stable (Shoop, 1993). Sur *T. colubriformis* de mouton (4 générations successives avec 100, 200, 250, et 225 µg/kg), la pression thérapeutique était alors exercée sur les stades immatures de chaque génération (Giordano *et al.*, 1988 ; *in* Shoop, 1993). Bien que le développement, *in vitro*, des larves sélectionnées, est moins inhibé en présence d'ivermectine que celui des larves non sélectionnées ; un essai de contrôle chez le mouton avec un traitement dirigé sur les stades immatures est peu concluant parce que 150 µg/kg font disparaître tous les vers résistants et pas 200 µg/kg. Cependant l'essai à de forts dosages contre les adultes produit 58% de réduction. Cette publication représente la première observation suggérant que la résistance à l'ivermectine déclarée sur un stade parasitaire, se manifeste aussi sur les autres stades.

Un troisième laboratoire a isolé une souche de *T. colubriformis* résistante. C'est une souche résistante au thiabendazole qui est ensuite sélectionnée après une pression thérapeutique sur 20 générations. Bien qu'une différence du FECR soit notée au bout de dix générations, c'est la vingt-et-unième génération qui est titrée et comparée à l'isolat parental. 0,019 mg/kg font disparaître 95% des parents sensibles et 0,034 mg/kg font disparaître le même pourcentage de la descendance des F<sub>21</sub> résistants (Shoop *et al.*, 1990).

#### In vivo :

Elle a été évoquée sur *H. contortus*, en Afrique du sud (Carmichael *et al.*, 1987 ; *in* Rolfe, 1990), après traitements réguliers à deux à trois semaines d'intervalle. La présence d'un organisme résistant à l'ivermectine fut pour la première fois détecté en Afrique du Sud en novembre 1985, 33 mois après l'introduction de la molécule. Des moutons se situant dans un élevage de la région du Cap furent traités 26 fois en 32 mois, seulement avec l'ivermectine. La faune helminthique originale de ce climat de type méditerranéen est composée chez le mouton de genres variés comme *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Nematodirus* et *Haemonchus* (bien que ce dernier soit moins commun). Cependant, les résultats montrèrent, après un traitement aux doses usuelles, une élimination de toutes les espèces excepté *H. contortus* (l'efficacité contre ce dernier étant inférieure à 50%). Les conditions générales de cette découverte furent rapportées dans une brève note dans le *Journal of the South African Veterinary Association* par Carmichael *et al.*, en 1987. Plus récemment, après 11 traitements sur une période de deux ans et demi, quatre isolats d'*H. contortus* chez le mouton furent décrits en 1988 puis cinq en 1989 (Van Wyk *et al.*, 1988 ; Van Wyk *et al.*,

1989 ; *in* Rolfe, 1990). Un isolat, *White River Krtz*, démontra une résistance multiple au fenbendazole, au rafoxanide et au closantel, mais semblait sensible au lévamisole et au nitroxylnil (Jeannin *et al.*, 1990 ; *in* Shoop, 1993).

Au Brésil : sur un isolat d'*H. contortus* de mouton, en 1987, après 32 traitements, sur une période de quatre années et demi (Echevarria et Trindate, 1989). Les doses usuelles d'ivermectine entraînaient 59% de réduction de vers adultes, toutes les autres espèces étant sensibles. Des études plus approfondies sur cet isolat montrent que la résistance à l'ivermectine concerne les stades L<sub>4</sub> et les stades adultes. De plus, cet isolat était aussi résistant aux benzimidazoles et sensible au lévamisole. En 1992, une autre souche d'*H. contortus* résistante à l'ivermectine est isolée au Brésil (Vieira *et al.*, 1992 ; *in* Shoop, 1993), et les doses usuelles employées ne détruisaient que 18% des adultes. Cet isolat était aussi résistant multiple aux benzimidazoles, au nétohimin mais était sensible au trichlorfon.

En Nouvelle-Zélande : quatre observations de souche d'*O. circumcincta* chez la chèvre sont actuellement décrites. Trois en 1990 (Watson et Hosking, 1990 ; Badger et McKenna, 1990 ; McKenna *et al.*, 1990 ; *in* Shoop, 1993), et une en 1992 (Pomroy *et al.*, 1992 ; *in* Shoop, 1993). Sur l'étude de Watson et Hosking en 1990, l'ivermectine aux doses usuelles est donnée 10 à 12 fois par an aux chevreaux et les adultes sont dosés 5 à 9 fois l'an entre 1982 et 1987. Cet isolat est aussi résistant à l'oxfendazole et au morantel, et toutes les autres espèces de Nématodes sont sensibles à l'ivermectine. Dans ce cas, le traitement à l'ivermectine élimine la production des oeufs dans cette souche d'*Ostertagia*, en dépit de la survie des vers. Les auteurs remarquent que ce phénomène peut avoir un effet sur les essais de réduction du dénombrement des oeufs dans les fèces (Fecal Egg Count Reduction : FECR). Une baisse de la fécondité des vers survivant au traitement a été aussi observée chez *Cooperia curticei* (McKellar *et al.*, 1988 ; *in* Shoop, 1993), et chez la souche *White River Krtz* d'*H. contortus*. Pour Badger *et al.*, en 1990 (*in* Shoop, 1993), le traitement est effectué 9 fois par an de 1986 à 1989 ; toutes les autres espèces sont sensibles et une résistance à d'autres molécules n'a pas été montrée. McKenna *et al.*, en 1990 (*in* Shoop, 1993), évoquent deux cas d'*Ostertagia* résistant à l'ivermectine en utilisant les essais FECR. Dans un des cas, on remarque une forte présence d'oeuf de *Trichostrongylus sp.* restant viables après le traitement. La souche d'*Ostertagia* montre également une résistance multiple au lévamisole et à l'oxfendazole. Dans la quatrième observation par Pomroy *et al.*, en 1992, Le traitement entraîne une réduction du dénombrement des oeufs fécaux d'*Ostertagia* de 27%. Les chèvres

sont traitées six fois dans l'année précédente (mais elles sont en contact avec des moutons traités périodiquement depuis huit ans, source potentielle de la souche résistante). Cet isolat montre aussi une résistance multiple à l'oxfendazole, le fenbendazole et le lévamisole.

En Australie : pas de description de résistance jusqu'à présent. Possibilité de résistance de souches d'*O. circumcincta* chez le mouton d'après le *Western Australia Department of Agriculture (in Shoop, 1993)*.

Aux U.S.A. : une résistance in vivo sur *H. contortus* a été décrite par Craig *et al.*, en 1990 (*in Shoop, 1993*), au Texas, sur des chèvres angora. L'ivermectine est donnée toutes les trois semaines durant le printemps et l'été, avec des alternances occasionnelles de benzimidazoles, pendant cinq ans. Lorsque des signes d'haemonchose sont évidents malgré le traitement, le FECR alors pratiqué montre une réduction de 55 % seulement. Cette souche est aussi résistante à l'oxfendazole mais pas au lévamisole.

En Europe : le seul cas décrit est une résistance d'une souche d'*Ostertagia* de chèvre en Ecosse (Jackson *et al.*, 1992 ; *in Shoop, 1993*). Le traitement est donné 16 fois de 1988 à 1990. Cette souche est aussi résistante au fenbendazole et sensible au lévamisole.

Comme Jackson *et al.* en 1992 le montrent, les définitions acceptées de la résistance se concentrent sur la capacité de survie au traitement aux doses thérapeutiques recommandées. Ces définitions énonçant que la résistance aux drogues à large spectre n'arrive que lorsque le "niveau normal", la "dose thérapeutique", ou la "dose usuelle" ne sont pas suffisamment efficaces, laissent échapper le moment précis du développement de la résistance. Il existe une fenêtre de flou entre ce moment et l'instant où les facteurs de résistance rendent la dose usuelle inefficace. Par exemple, l'ivermectine à 20 µg/kg est à 95 % efficace contre l'adulte d'*H. contortus* chez le mouton, mais la dose thérapeutique se situe à 200 µg/kg. Si le critère de "dose usuelle" est ici utilisé, alors la perte de sensibilité d'un facteur dix apparaîtra avant que la résistance ne soit formellement déclarée.

#### F-2) Essais de détection de la résistance à l'ivermectine :

Jusqu'à présent, seul le test de FECR ou les tests recourant à l'autopsie sont utilisés pour la détection de la résistance (doses usuelles recommandées comme seuil de résistance). Il est clair que l'emploi de l'autopsie suivant le traitement ne peut pas représenter une

procédure de routine pour la surveillance de la résistance et l'on ne connaît pas la sensibilité des essais de FECR pour la détection des résistances à l'ivermectine pour des basses fréquences.

Cinq essais *in vitro* sont actuellement décrits, mais aucun n'est applicable en routine. Tous furent évalués sur des isolats résistants aux doses usuelles d'ivermectine. On ne connaît pas leur capacité à détecter une résistance quand la fréquence génétique est basse.

Le premier est un essai de développement larvaire *in vitro*, dans lequel des oeufs de *T. colubriformis* sont incubés en présence de concentrations variées d'ivermectine, et, six jours plus tard, les proportions des stades larvaires L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> vivants, sont comparées (Giordano *et al.*, 1988 ; *in* Shoop, 1993). Bien qu'une courbe-réponse linéaire ne puisse être mise en évidence, il fut trouvé un plus fort pourcentage de L<sub>3</sub> de la souche résistante survivant que de L<sub>3</sub> de la souche sensible, et ce à toutes concentrations.

Une autre publication utilise le développement *in vitro* de stades L<sub>1</sub> à L<sub>3</sub> pour comparer la souche *White River Krtz* d'*H. contortus* à une souche sensible (Taylor *et al.*, 1990 ; *in* Shoop, 1993). Une fois de plus, l'obtention d'une courbe-réponse linéaire n'est pas possible, mais une concentration plus forte d'ivermectine est alors demandée pour inhiber la souche résistante par rapport à la souche sensible.

Un troisième essai *in vitro* permet le développement d'oeufs de stades L<sub>3</sub> de souche résistante et sensible d'*H. contortus*, avec sensiblement les mêmes conclusions (Lacey *et al.*, 1990 ; *in* Shoop, 1993).

Le quatrième exemple montre non seulement une augmentation de la dose d'ivermectine pour la souche résistante d'*H. contortus* mais aussi une courbe dose-réponse plus linéaire (Hubert et Kerboeuf, 1992 ; *in* Shoop, 1993 ). Les essais utilisant le développement des oeufs jusqu'au stade L<sub>3</sub>, détectent non seulement les résistances à l'ivermectine mais aussi les résistances aux antihelminthiques à large spectre comme les benzimidazoles et le lévamisole.

Le cinquième essai se porte sur l'examen de la mobilité larvaire de la L<sub>3</sub> de six isolats résistants et quatre sensibles d'*H. contortus*. Les larves sont incubées, dans le noir, dans des concentrations variées d'ivermectine, puis exposées à la lumière pour stimuler celles non paralysées. Les six isolats résistants ont tous besoin d'une dose supérieure d'ivermectine pour inhiber leur mobilité (par rapport aux quatre isolats sensibles). De plus, on ne remarque aucune différence dans la sensibilité à l'ivermectine entre les souches sensibles aux

benzimidazoles ou au lévamisole et les souches résistantes aux benzimidazoles ou au lévamisole. Les auteurs concluent qu'il n'existe pas de résistances croisées dans la famille des avermectines (Gill *et al.*, 1991 ; *in* Shoop, 1993).

Des analyses d'isoenzymes ont été aussi utilisées pour distinguer les souches résistantes à l'ivermectine des sensibles. L'utilisation de gel d'amidon pour l'électrophorèse, permet la caractérisation d'un isolat résistant d'*H. contortus* ne montrant pas d'activité propionyl-estérases, contrairement à l'isolat sensible (Echevarria *et al.*, 1992 ; *in* Shoop, 1993). Cependant, dans le même essai, d'autres isolats, possédant une résistance multiple aux benzimidazoles et à l'ivermectine, possèdent une activité propionyl-estérase. L'imputabilité de cette enzyme dans les mécanismes de résistance n'est pas encore claire. Il serait intéressant de connaître si la résistance à l'ivermectine se caractérise par un mécanisme de base pouvant être détecté génétiquement ou biochimiquement par un test de routine. Un tel test serait du plus grand intérêt.

### F-3) Les mécanismes de la résistance à l'ivermectine :

Peu d'études actuellement fournissent un début d'explication. Une publication comparant la pathogénicité de l'isolat *White River Krtz* à un isolat sans lien de parenté mais sensible d'*H. contortus* de mouton, étudie l'anémie provoquée, les protéines plasmatiques et les dommages sur l'abomasum chez le mouton. Aucune différence entre les deux groupes n'est retrouvée (Scott et Amour, 1991 ; *in* Shoop, 1993). Les auteurs concluent que la réduction de la charge parasitaire n'est probablement pas le mécanisme de résistance de cet isolat.

Une seconde étude compare le volume cellulaire et les protéines totales de sang de mouton infecté par une souche résistante et sensible d'*H. contortus* et ne trouve aucune différence (De Vaney *et al.*, 1992 ; *in* Shoop, 1993).

### Génétique de la résistance à l'ivermectine chez *Caenorhabditis elegans* :

Johnson *et al.* en 1989 (*in* Le Jambre, 1990) ont sélectionné des *C. elegans* résistants aux avermectines en les cultivant dans des cupules d'agar contenant de l'ivermectine. Le type sauvage de *C. elegans* ne se développe pas sur les cupules contenant 2 ng/ml de la molécule. Le traitement fut poursuivi par l'incubation des vers avec de l'éthylméthanesulfonate (EMS), un mutagène induisant un point de mutations (transitions : GC → AT). Les auteurs trouvent

approximativement 1 génome sur 70 portant une mutation de résistance, lui permettant de résister à 5 à 10 ng/ml d'ivermectine. La résistance spontanée à des doses similaires d'ivermectine est calculée pour être de l'ordre de 1 cas sur 5000 vers de type sauvage. Les souches résistantes à de fortes doses d'ivermectine sont plus rares (en suivant un traitement à l'EMS, 1 génome sur  $10^7$  possède une résistance à 100 ng/ml).

Day *et al.*, en 1989 (*in* Le Jambre, 1990), ont isolé plus de 250 souches de *C. elegans* résistantes, dont environ 200 possèdent une seule mutation leur conférant une résistance à 5 à 10 ng/ml. Des liaisons (linkage), des complémentations, des expérimentations de cartographie (mapping) furent utilisées pour déterminer les deux-tiers des mutations arrivant sur un des 23 gènes *avr* (avermectin resistant) résistants à l'ivermectine distribués sur cinq chromosomes. Environ 50 souches furent isolées avec un niveau de résistance de 20 à 25 ng/ml. La résistance dans plusieurs de ces souches semble conférée par une unique mutation récessive au-dessus des gènes *avr*. D'autres mutations semblent être des mutations dominantes. Deux mutations, essentielles pour un bas niveau de résistance, procurent une résistance d'au moins 10 souches de haut niveau. La double mutation a été trouvée pour cartographier de nouveaux gènes *avr*, et pas pour les 23 déjà décrits. Si les mécanismes de la résistance à l'ivermectine chez les Nématodes parasites est le même que ceux de *C. elegans*, alors il représente un système polygénique.

#### F-4) Résistance de famille (side-resistance) :

Les avermectines et les milbemycines sont structuralement similaires et agissent par le même mode d'action. Les avermectines sont des milbémycines glycosylées ou les milbémycines sont des avermectines déglycosylées (figure No. 7 et No. 8). Il est maintenant démontré que les isolats résistants à l'ivermectine sont simultanément résistants à la moxidectine (figure No. 8), un analogue des milbémycines (Shoop *et al.*, 1992, 1993). Aucun des isolats utilisés n'a été antérieurement exposé à la moxidectine, et les facteurs de résistance de la moxidectine sont semblables à ceux de l'ivermectine. Les dosages de moxidectine utilisés pour détruire 95 % des isolats résistants à l'ivermectine d'*O. circumcincta* et *T. colubriformis* sont, respectivement, 31 fois et 9 fois plus forts que ceux nécessaires pour détruire les isolats sensibles ; tandis que les mêmes isolats respectifs ont besoin de 23 fois et 6 fois plus d'ivermectine par rapport aux isolats sensibles. La résistance à l'ivermectine et celle à la moxidectine résultent donc d'un mécanisme similaire.

Une autre étude montre des résultats semblables entre l'ivermectine et la moxidectine chez *H. contortus* d'un modèle rongeur (Shoop, 1993). A l'aide de données électrophysiologiques, les auteurs prouvent que l'ivermectine et la moxidectine agissent par le même mode d'action en abaissant la résistance de la membrane musculaire et en hyperpolarisant la fibre musculaire du crabe commun dans un essai sur la conductance de la membrane. La conclusion de cette expérience montre que l'ivermectine ouvre les canaux chlorures de la membrane musculaire (Pankavich *et al.*, 1992 ; Craig *et al.*, 1992 ; *in* Shoop, 1993). Nous pouvons donc parler de résistance de famille.

Des résistances de famille ont été aussi montrées sur six souches résistantes à l'ivermectine d'*H. contortus* également résistantes à l'ivermectine B<sub>1</sub> et à l'ivermectine B<sub>2</sub> sur un essai de mobilité larvaire (Gill *et al.*, 1991 ; *in* Shoop, 1993).

#### F-5) En conclusion :

- Une résistance à l'ivermectine n'est trouvée que sur les Nématodes des chèvres et des moutons.
- Aucun type de résistance à l'ivermectine sur les helminthes n'est détecté chez les bovins, les équins, les porcins et les canins.
- Aucun type de résistance sur les Arthropodes n'est décrit sur n'importe quel animal.
- De nombreux cas de résistance à l'ivermectine sont dus à un usage intensif sur plusieurs années.
- De nombreux cas de résistances à l'ivermectine développent une résistance multiple avec d'autres groupes.
- De nombreuses données semblent affirmer que la résistance à l'ivermectine est stable.
- Les mécanismes intimes de la résistance à l'ivermectine n'ont pas encore été élucidés.
- La résistance à l'ivermectine sur un stade de développement parasitaire se manifeste aussi sur les autres stades.
- Il n'existe pas encore d'essai de routine pour détecter la résistance à l'ivermectine.
- Il n'existe pas de cas de résistance croisée à l'ivermectine.
- Il existe une résistance de famille, *in vitro*, entre l'ivermectine et l'ivermectine B<sub>1</sub>.
- Il existe une résistance de famille, *in vivo*, entre l'ivermectine et la moxidectine.
- Les ivermectines et les milbémycines possèdent le même mode d'action.

## 5-2-1-3-2 - LA PIPÉRAZINE ET LA DIÉTHYLCARBAMAZINE :

### A) Chimie et pharmacocinétique :

La diéthylènediamine pipérazine, ou l'hexahydropipérazine (figure No. 6), est un composé cristallin alcalin utilisé dans le traitement de la goutte depuis 1891 (*in Arundel et al.*, 1983). La pipérazine (poids moléculaire : 86,1) est disponible sous forme d'hexahydrate (poids moléculaire : 194,1), d'adipate (poids moléculaire : 232,3), de citrate (poids moléculaire : 642,68), de phosphate (poids moléculaire de 184) et de tartrate (poids moléculaire : 236,2). La pipérazine et l'hexahydrate, l'adipate et le citrate sont très solubles dans l'eau. Le phosphate est très peu soluble dans l'eau (*Arundel et al.*, 1983).

La pipérazine est rapidement absorbée par le tractus gastro-intestinal. En 24h,  $33,2 \pm 8,3\%$  de la dose est excrétée par les urines (Oelkers, 1959 ; *in Arundel et al.*, 1983). La répartition chez le rat de la pipérazine marquée se décompose en 27% pour les muscles, 8,5% pour le foie, 7,8% pour les reins, 7,1% pour les os, 12% pour l'intestin grêle, 3,9% pour l'estomac et 3,3% pour le gros intestin, de la dose administrée (Savin *et al.*, 1977 ; *in Arundel et al.*, 1983). Chez les rats, une interaction pipérazine-nitrite dans l'estomac permet la formation de dérivés de nitrosation de la pipérazine (Sander *et al.*, 1975 ; *in Arundel et al.*, 1983). La *N,N*-dinitrosopipérazine et la *N*-mononitrosopipérazine sont alors formées et possèdent, toutes deux, un fort pouvoir carcinogène (la plus carcinogène étant la première ; adénome pulmonaire de la souris après traitement à long terme)(*in Arundel et al.*, 1983). Chez l'homme une mononitrosation apparaît (*in Arundel et al.*, 1983). La pipérazine est utilisée dans le traitement des ascaridoses et des oxyuroses en thérapeutique humaine sous la dénomination d'Antelmina<sup>®</sup>, et de Nématorazine<sup>®</sup> en deux cures de 7 jours de 50 mg/kg/j (pour l'adulte), espacées de 15 à 20 jours pour l'oxyurose et une cure de 3 à 5 jours pour l'ascaridiose.

La diéthylcarbamazine (figure No. 6), (DEC ou 1-diéthylcarbamil 4-méthyl pipérazine) est efficace sur les adultes de filaire comme *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Loa loa*. Elle est aussi microfilaricide sur *O. volvulus*. Elle est commercialisée en thérapeutique humaine sous la dénomination de Notézine<sup>®</sup> et son mode d'emploi est particulier en raison des risques de lyse des microfilaires entraînant des réactions allergiques graves avec encéphalite et coma. Sa posologie demande donc de débiter le traitement

progressivement par 1/32<sup>e</sup> de comprimé (3 mg) pour les loases avec microfilarémie et par 1/4, 1/2 comprimé pour les autres filarioses, jusqu'à 6 mg/kg/j en 5 à 8 jours, maintenus pendant 21 jours. Cet antihelminthique, étant utilisé depuis 1957, est maintenant abandonné comme strongylicide du fait de l'étroitesse de son spectre (traitement de la bronchite vermineuse à *Dictyocaulus sp.* dans sa phase prépatente) et de sa mauvaise tolérance locale et générale ; il reste essentiellement actif sur les filaires et ne sera pas développé dans cet exposé.

#### B) Mode d'action :

Chez l'*Ascaris*, la pipérazine induit une paralysie réversible en affectant directement le système neuromusculaire (Norton et Beer, 1957 ; Osteux *et al.*, 1971 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Ces vers paralysés perdent leur capacité de maintien de l'implantation contre le péristaltisme de l'intestin grêle de l'hôte, et sont alors éliminés dans les fèces (Del Castillo, 1969 ; Van Den Bossche, 1976 ; *in* Arundel *et al.*, 1983). Del Castillo en 1969 (*in* Arundel *et al.*, 1983), étudie les effets de la pipérazine sur l'activité électrophysiologique de la cellule musculaire d'*Ascaris*. La pipérazine transforme le potentiel de base de la cellule musculaire, ce dernier passant de -30 à 45 mV. A cette valeur de potentiel, les potentiels d'action rythmiques disparaissent, entraînant une perte de la capacité de contraction du parasite et un effet d'Hyperpolarisation concomitant à la paralysie. Une augmentation de la perméabilité membranaire du muscle aux ions chlorures semble être à l'origine de cette hyperpolarisation. Del Castillo montre ensuite que le GABA induit le même effet que la pipérazine mais reste 100 fois plus puissant. Les récepteurs responsables de ces effets semblent être principalement localisés dans la région synaptique de la cellule musculaire. En 1980, et 1982, Martin (*in* Martin R.J., 1992), utilise les techniques du "voltage et current-clamp" pour étudier les variations de conductance liés au GABA et à la pipérazine sur la région "en sac" du muscle d'*Ascaris*. Le GABA et la pipérazine produisent une augmentation dose-dépendante de la conductance aux chlorures en agissant sur un récepteur extra-synaptique. La pipérazine est alors de 10 à 100 fois moins puissante que le GABA. Il existe à la fois des récepteurs synaptiques localisés dans le syncytium, activés par la pipérazine, et des récepteurs extra-synaptiques sur la surface musculaire "en sac". La pipérazine et le GABA agiraient donc sur le même récepteur. En fait, la pipérazine est un agoniste du récepteur au GABA, mais ne

possède pas le groupement carboxyle contrairement au GABA. Il semblerait donc que le récepteur GABA de l'*Ascaris* n'est pas besoin de ce groupement carboxyle pour l'ouverture du canal. De plus, la pipérazine est un agoniste du GABA plus efficace dans un environnement riche en CO<sub>2</sub>, ce dernier pouvant se combiner avec un atome d'azote de la pipérazine et former ainsi un groupement carboxyle (*in* Martin R.J., 1992).

Une incubation d'*A. lumbricoides* en présence de pipérazine, résulte en une baisse du niveau total de phospholipides. Ceci semble être expliqué par une stimulation de la phospholipase C (enzyme catabolique) et une inhibition de la choline kinase (enzyme anabolique), (Sasi et Ray, 1975 ; *in* Arundel *et al.*, 1983).

#### 5-2-2 - Composés découplant la phosphorylation oxydative:

Ce sont des composés à propriétés essentiellement trématocides (*F. hepatica* principalement). Cependant, certains de ces produits, fixés aux macromolécules plasmatiques, possèdent une activité sur les Nématodes hématophages (strongles digestifs du genre *Haemonchus*). Ces composés sont les salicylanilides (rafoxanide, closantel) et les nitrophénols substitués comme le nitroxinil. Ces molécules agiraient sur la paroi mitochondriale et découpleraient la phosphorylation oxydative après la synthèse de succinate (qui s'accumulerait dans la cellule sans production d'ATP). Les Nématodes meurent alors par absence de ressource énergétique. Une résistance aux salicylanilides d'*H. contortus* a été décrite chez le mouton en 1980, 1982, 1987 et 1989 par Van Wyk *et al.* en Afrique du Sud et par Rolfe, en Australie, en 1990. Le développement de la résistance au closantel n'est pas surprenant compte tenu du sous-dosage ingéré par les larves après le pic initial des concentrations plasmatiques chez l'animal traité. De plus, l'utilisation élargie du rrafoxanide pour le contrôle simultané d'*H. contortus* et *F. hepatica* est aussi pour beaucoup dans le développement de cette résistance. Cependant en Australie l'émergence de la résistance au closantel n'est pas liée à une utilisation antérieure de rrafoxanide et d'autres causes doivent être cherchées. Les salicylanilides ont été extensivement utilisés pour le contrôle d'*H. contortus* quand la résistance aux benzimidazole était importante, et leur utilisation s'effectuait le plus souvent en rotation avec le lévamisole et l'ivermectine. Ces composés possèdent de nombreux avantages :

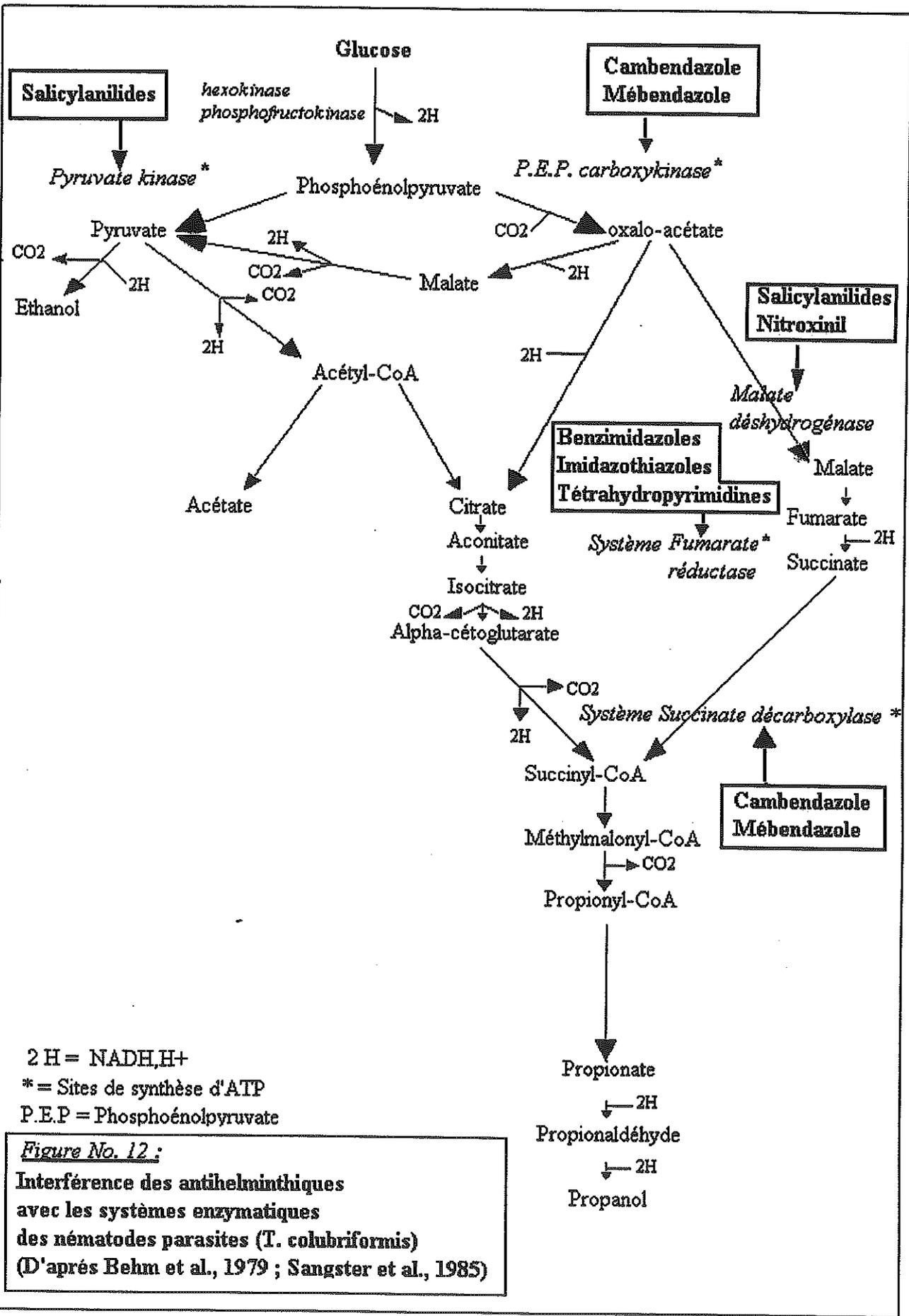
- 1 - ils possèdent un spectre étroit avec une activité contre les parasites intestinaux ingérant du sang ou en étroite association avec les produits sanguins. Ils possèdent une faible

activité contre les autres parasites intestinaux attaquant le mouton, par conséquent aucune sélection n'est appliquée sur ces derniers parasites par une utilisation régulière lors du contrôle des haemonchoses.

- 2 - le plus récent des salicylanilides, le closantel est capable de supprimer la charge parasitaire présente, mais protège aussi contre les larves ingérées pendant 6 semaines (Rolfe, 1990).

### 5-2-3 - Composés interférant avec le métabolisme énergétique :

Ce sont des produits agissant sur différents complexes enzymatiques du métabolisme intermédiaire anaérobie des helminthes (figure No. 12). Le blocage enzymatique qui en résulte entraîne l'accumulation de métabolites inutilisables toxiques pour le Nématode. Le ver meurt rapidement d'épuisement par défaut de synthèse d'ATP. Deux systèmes enzymatiques majeurs sont la cible d'antihelminthiques faisant pratiquement tous partie de la famille chimique des benzimidazoles et apparentés (plus quelques composés fasciolicides).



### 5-2-3-1 - Le système "succinate décarboxylase" :

Il se trouve inhibé par le cambendazole et le mébendazole (avec la phosphoénolpyruvate carboxylase) (figure No. 12).

### 5-2-3-2 - Le système "NADH-fumarate réductase" :

Ce passage est directement inspiré de l'article de Kita, en 1992.

Les adultes d'*Ascaris* résident dans l'intestin grêle des mammifères, où la tension en oxygène est limitée. Les mitochondries de la paroi musculaire des vers adultes fournissent un excellent modèle pour l'étude du métabolisme énergétique des Nématodes. Des études spectroscopiques et enzymatiques ont montré que ces mitochondries contiennent une petite quantité de complexe III (ubiquinol-cytochrome *c* oxydoréductase ; complexe *b-c<sub>1</sub>*) et aussi une petite quantité de complexe IV (cytochrome *c* oxydase) De plus, la participation d'un cytochrome de type *b*, appelé cytochrome *b*<sub>558</sub>, dans le système fumarate réductase a été observée à basse température.

La purification du complexe II comme la succinate ubiquinone oxydoréductase des mitochondries de l'adulte d'*Ascaris* débute les études biochimiques du système NADH-fumarate réductase. Le complexe II est un important complexe enzymatique du cycle de l'acide tricarboxylique et de la chaîne respiratoire aérobie de la mitochondrie. Le complexe II isolé d'*Ascaris*, contient un cytochrome *b*<sub>558</sub> succinate-réductible. En présence de la NADH-cytochrome *c* oxydoréductase (complexe I-III) de l'*Ascaris*, le cytochrome *b*<sub>558</sub> dans complexe II est aussi réduit avec le NADH et réoxydé avec le fumarate. La plus importante propriété du complexe II de l'*Ascaris* adulte est représentée par la présence d'une forte activité fumarate réductase (FRD), qui est la réaction réverse de l'activité succinate-ubiquinone oxydoréductase (SDH). Le rapport SDH sur FRD dans le complexe II de l'adulte d'*Ascaris* est de 0,05 (*E. coli*, 0,03 ; enzyme hépatique de raten aérobie, 20). Ce complexe représente 8% des protéines mitochondriales de l'adulte d'*Ascaris*.

L'ordre de fonctionnement de la composante respiratoire du système de la NADH-fumarate réductase est le suivant (figure No. 13<sub>a</sub>) : dans cette chaîne anaérobie, les équivalents réduits sont acceptés par le complexe I et transférés au complexe II par la rholoquinone, puis sont finalement oxydés par l'activité fumarate réductase du complexe II.

Ce transfert d'électrons du NADH au fumarate aboutit dans le site I à la phosphorylation par la pompe à protons dans le complexe I. Dans la rholoquinone, le groupement méthyl de l'ubiquinone est substitué par un groupement aminé (2-amino-3-méthoxy-6-méthyl-5-isoprenyl-1,4-benzoquinone), et son potentiel rédox  $E_m$ , (-63mV) montre une valeur encore plus négative que celle de l'ubiquinone (+110mV).

L'avantage de cette chaîne respiratoire est sa capacité de synthèse de l'ATP, même en l'absence d'oxygène. La différence entre le potentiel rédox du couple  $NAD^+/NADH$  ( $E_m$ , = -320mV) et le couple fumarate/succinate ( $E_m$ , = +30mV) est suffisamment importante pour permettre la formation d'un ATP. Le complexe II des mitochondries musculaires de l'adulte d'*Ascaris* fonctionne comme une oxydase terminale et un donneur d'électrons au fumarate, qui est le dernier accepteur sous conditions anaérobies.

Le complexe II est composé généralement de quatre polypeptides. La grande sous-unité de la flavoprotéine (Fp) de 70 kDa, contient une flavine liée par covalence (FAD). Une deuxième grande sous-unité (Fer-sulfure), (Ip) de 30kDa renferme trois types différents d'interactions fer-soufre : S-1 (2Fe-2S), S-2 (4Fe-4S), S-3 (3Fe-4S). Des études plus précises ont montré une relation entre la forte activité fumarate réductase et les propriétés rédox du groupement S-3 du complexe II. Les sous-unités Fp et Ip sont hydrophiles et forment la portion catalytique du complexe. Deux petits polypeptides hydrophobes, ancrés dans la membrane, sous-unités du cytochrome *b*, semblent être essentielles à l'interaction entre le complexe enzymatique et les groupements quinones. La sous-unité Fp est le site de la conversion succinate-fumarate.

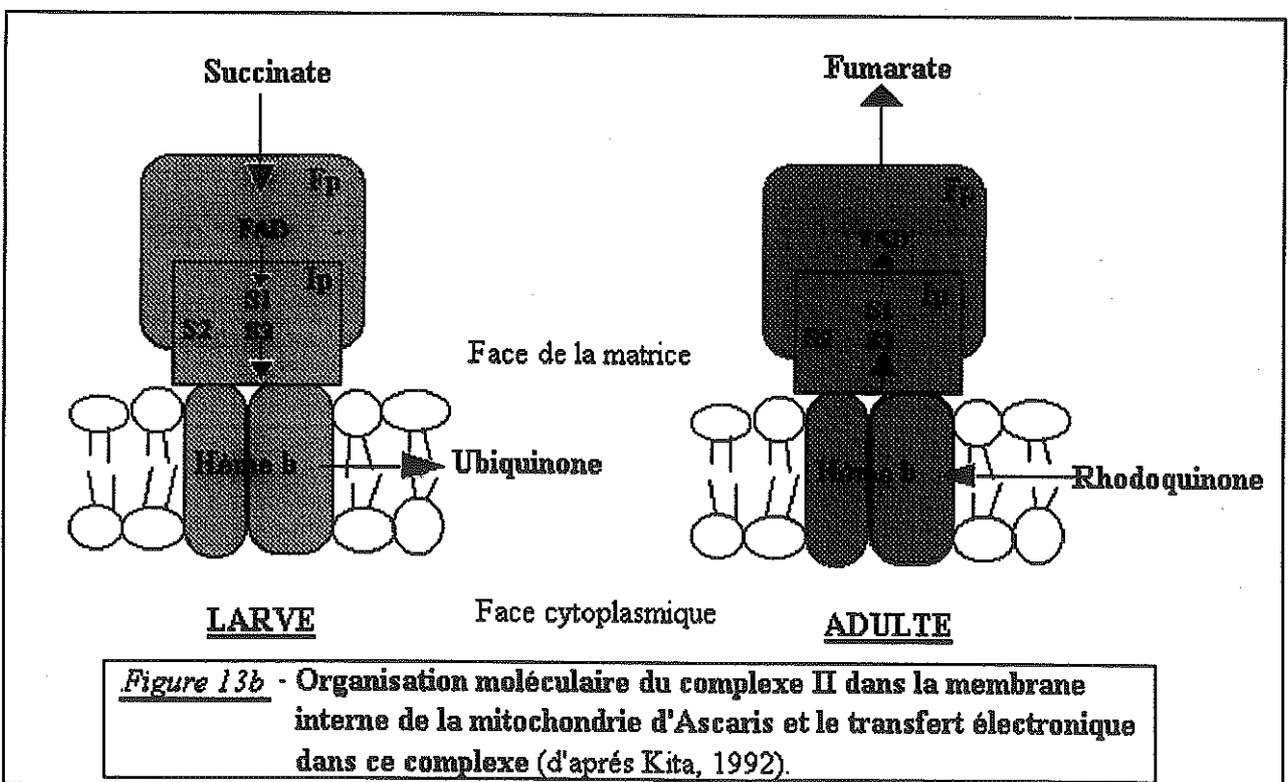
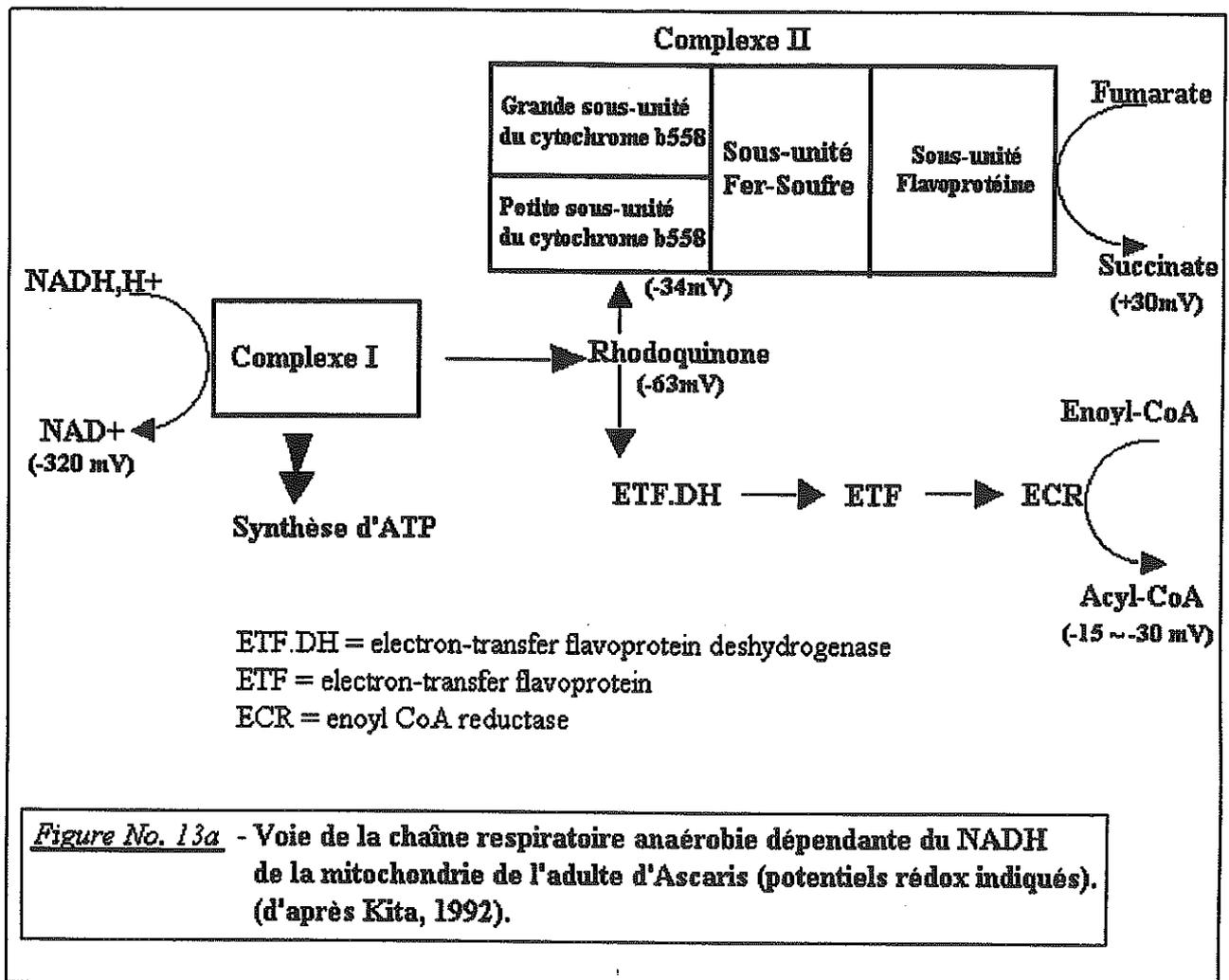
Diverses analyses immunologiques, tendent à prouver que le complexe II de l'*Ascaris* dériverait du complexe II d'une mitochondrie travaillant en aérobie, possédant une activité succinate déshydrogénase, et que l'activité fumarate réductase du complexe II de l'*Ascaris* serait un acquis de l'adaptation du parasite.

En résumé, le bas potentiel de la rholoquinone, le bas potentiel du groupement S-3, et le potentiel plus positif du cytochrome  $b_{558}$  apparaissent être les caractéristiques principales de la chaîne respiratoire anaérobie de l'*Ascaris* adulte, indiquant que le transfert d'électrons du NADH au fumarate est possible.

En plus du succinate, il existe des acides gras à chaîne branchées comme produits terminaux s'accumulant (2-méthylbutyrate, 2-méthylvalérate) lors du catabolisme des hydrates de carbone de l'*Ascaris*. Ces produits proviennent de la condensation de l'acétyl CoA et de

réductions ultérieures en acides saturés par un renversement de la  $\beta$ -oxydation. Ce système est localisé dans les mitochondries et représenté sur la figure No. 13<sub>a</sub>. Le rôle principal de cette voie serait la maintenance de la balance rédox de la mitochondrie en permettant l'écoulement de l'excès de pouvoir reducteur.

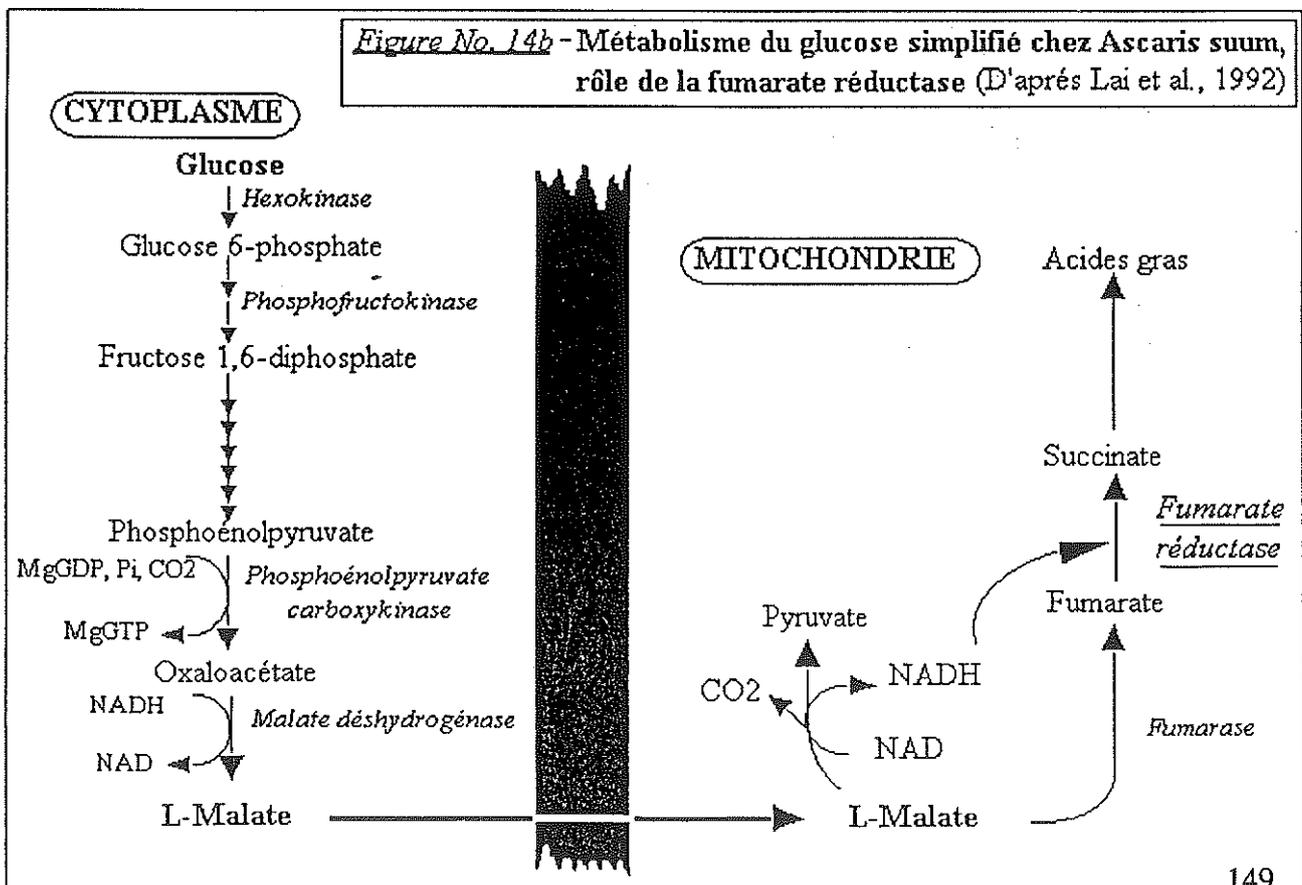
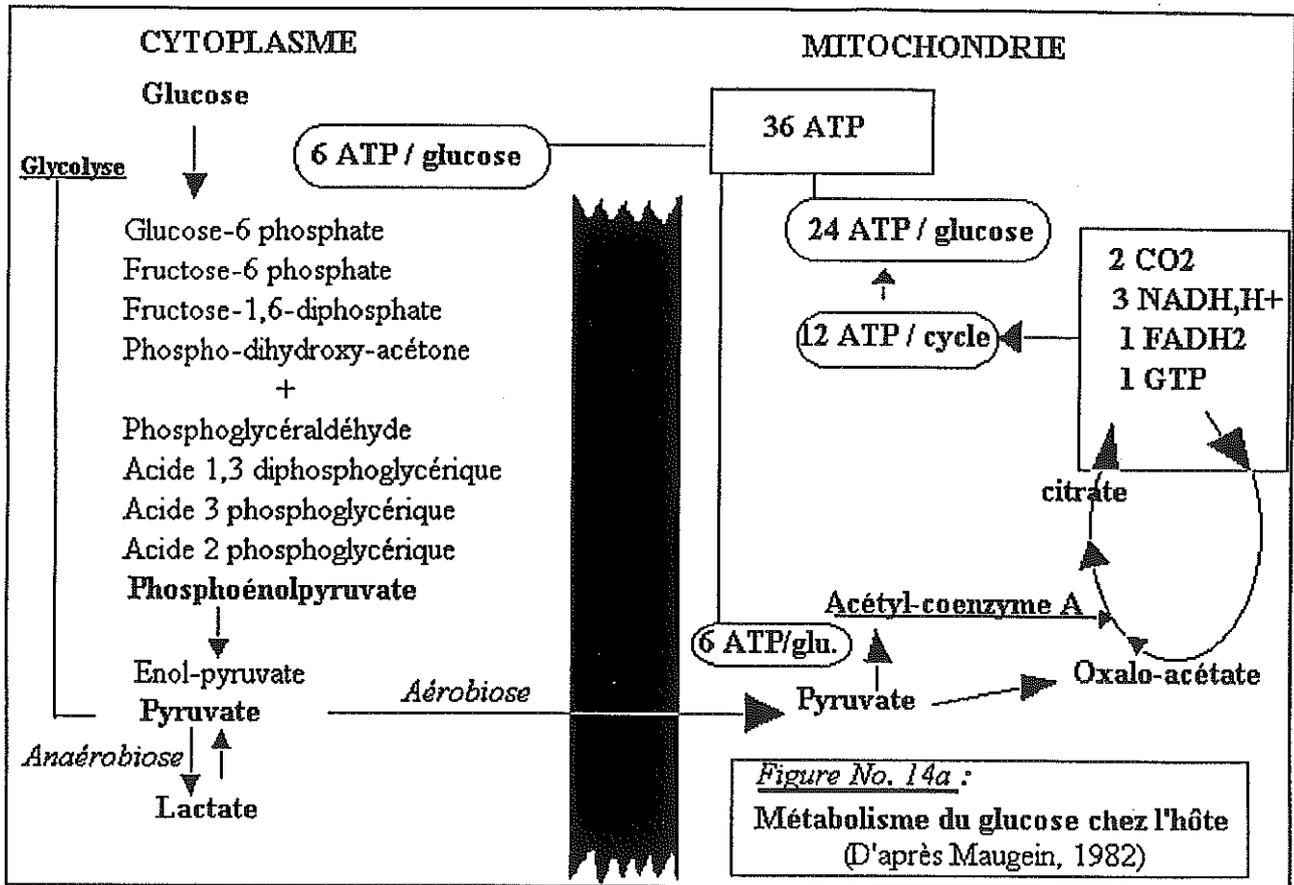
Il est important de noter qu'il existe des changements du métabolisme énergétique chez les Nématodes au cours du développement. Par exemple l'oxygène est obligatoire pour le développement des oeufs. Un cycle actif de l'acide tricarboxylique et un apport d'oxygène sensible au cyanide sont démontrés chez la larve L<sub>2</sub>. A ce stade la chaîne respiratoire est semblable à celle de son hôte mammifère (figure 13<sub>b</sub>). Le changement du rapport SDH sur FRD durant le cycle de vie suggère que deux isoformes du complexe II sont présents chez l'*Ascaris*. En contraste avec la mitochondrie de l'adulte, qui contient la rholoquinone comme quinone majeure, la quinone la plus importante pour les L<sub>2</sub> est l'ubiquinone. Puisque la rholoquinone est synthétisée à partir de l'ubiquinone, l'induction de l'enzyme catalysant cette conversion peut être programmée, comme d'autres enzymes pour le système respiratoire anaérobie. La synthèse d'enzymes qui participent à la phosphorylation oxydative chez les L<sub>2</sub> est supprimée chez l'adulte, bien que certaines soient encore exprimées. Tous les complexes de la chaîne respiratoire, excepté le complexe II, dont tous les gènes sont codés par le noyau, sont les produits de gènes de l'ADN nucléaire et mitochondrial. Durant le développement de l'*Ascaris*, la transition du métabolisme énergétique aérobie à une mécanisme anaérobie, peut se dérouler pendant la troisième mue de L<sub>3</sub> à L<sub>4</sub>, dans l'intestin grêle.



### 5-2-3-3 - Résistance et fumarate réductase :

Le système "*fumarate réductase*", est lui aussi inhibé par les benzimidazoles, et, à un degré moindre (Prichard *et al.*, 1970 ; Malkin et Camacho, 1972 ; Prichard *et al.*, 1973 ; *in* Beugnet, 1991), par les imidazothiazoles et les tétrahydropyrimidines. Cette inhibition de la fumarate réductase, bien que restant un des mécanismes clef de l'action des benzimidazoles, est aujourd'hui minorée en faveur de la fixation de ces derniers sur la tubuline  $\beta$  parasitaire. De plus le mébendazole est sans effet sur cette enzyme (car absence du noyau thiazole permettant l'interaction benzimidazoles-fumarate réductase).

Le métabolisme des hydrates de carbone chez les helminthes diffère de celui de leurs hôtes vertébrés car il est préférentiellement anaérobie et constitue la principale source d'énergie du parasite. En effet, la mitochondrie de nombreux parasites possède un métabolisme énergétique de type anaérobie dans lequel la réduction liée au NADH du fumarate en succinate (activité fumarate réductase) est une des réactions les plus importantes (Bryant *et al.*, 1983). L'hôte ainsi que le parasite transforment le glucose en phosphoénolpyruvate (voie "d'Embden-Meyerhof"); ensuite, chez l'hôte, il y a formation de pyruvate dans le cytoplasme grâce à la pyruvate kinase (figure No. 14<sub>a</sub>). Chez le parasite, ce mécanisme n'a pas lieu et il transforme alors le phosphoénolpyruvate en oxaloacétate réduit en malate (figure 14<sub>b</sub>). Le malate cytoplasmique ainsi formé, passe alors dans les mitochondries. La décarboxylation oxydative du malate conduit au pyruvate puis à l'acétate. Le NADH, H<sup>+</sup> ainsi formé sert à réduire une partie du malate en fumarate puis par la fumarate réductase en succinate avec formation d'ATP (Maugein, 1982) et ensuite en propionate (figure 14<sub>c</sub>). Il a été suggéré que l'éthanol et le propanol terminaux seraient dus à la réduction respective de l'acétate et du propionate précédemment formés (Sangster *et al.*, 1985). C'est en 1970 que Prichard (*in* Malkin et Camacho, 1972) montre que le thiabendazole inhibe la fumarate réductase chez *H. contortus*. Malkin et Camacho, en 1972, confirment l'action du thiabendazole et montrent aussi que le cambendazole est un inhibiteur de la fumarate réductase encore plus puissant. De plus, ces auteurs prouvent que la fumarate réductase d'une souche résistante d'*H. contortus* est devenue insensible au thiabendazole. Donc le thiabendazole et le cambendazole inhiberaient la fumarate réductase de souches sensibles d'*H. contortus*, mais cet effet serait considérablement réduit sur les souches résistantes.



L'inhibition de la fumarate réductase est importante car cette enzyme est un accepteur d'électron terminal dans le métabolisme de nombreux helminthes (*in Malkin et Camacho, 1972*). La réduction du fumarate en succinate régénère aussi du NAD et semble produire de l'ATP (*in Malkin et Camacho, 1972*) ; donc l'inhibition de ce système n'empêche pas seulement la formation de succinate, mais aussi la formation d'ATP et la régénération de NAD. Plus précisément, le fumarate sert d'accepteur pour les équivalents réduits générés par la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate. Cette réaction implique un système de transport d'électron mitochondrial et, chez *Ascaris*, est couplé avec la phosphorylation de l'ADP (Bryant et Bennett, 1983). Si l'oxygène est présent, le système anaérobie continue à fonctionner, mais les électrons semblent passer à l'oxygène par un système de transport cyanide et antimycine A insensible aux électrons ; le produit terminal de ce système étant le peroxyde d'hydrogène. Bennett et Bryant, en 1984 comparent le métabolisme énergétique *in vitro* de l'adulte d'*H. contortus* résistant et sensible. La mesure de la concentration des intermédiaires et des produits terminaux du métabolisme du glucose sur cette espèce ne révèle pas de différence entre les souches résistantes et sensibles. La composition quantitative des réserves en hydrate de carbone entre espèces d'helminthes varie considérablement. La réserve en hydrate de carbone principale pour toutes les souches est représentée par un disaccharide : le tréhalose. Ceci contraste avec les autres espèces étudiées, où le pool de tréhalose reste plus important que celui du glucose, le glycogène étant le principal hydrate de carbone. La synthèse du tréhalose semble avoir besoin de moins d'énergie que le glycogène, c'est un composé chimiquement stable et n'est pas sujet aux oxydations et aux dégradations du glucose. Il est fortement soluble et osmotiquement actif contrairement au glycogène (Bennet et Bryant, 1984). Les réserves d'hydrates de carbone furent métabolisées par *H. contortus*, pendant l'incubation *in vitro*. La taille du pool de tréhalose diminue de façon similaire dans toutes les souches, cependant dans les souches sensibles, il y a une utilisation préférentielle du glycogène. Les souches résistantes paraissent plus économiques dans leur utilisation des réserves en glycogène sur une période de 18 heures d'incubation. De plus, Bennet affirme qu'il existe des différences entre les souches résistantes liées aux différents modes d'action de chaque benzimidazole sur la chaîne respiratoire. Ainsi le mébendazole (mais pas le thiabendazole), inhibe l'utilisation du glucose chez les Nématodes (Van Den Bossche, 1972 ; *in* Bennet et Bryant, 1984) et la résistance peut sélectionner les individus ayant la meilleure utilisation du minimum de glucose. Au contraire, le

thiabendazole (mais pas le mébendazole) inhibe le système fumarate réductase chez l'adulte d'*H. contortus*. La résistance peut alors sélectionner les individus possédant la capacité de maintenir une production énergétique par une voie aérobie alternative. Selon Sangster *et al.*, en 1985, l'acétate, le propionate, l'éthanol et le propanol sont les principaux produits terminaux libérés pendant l'incubation de souches résistantes et sensibles au thiabendazole de *T. colubriformis*. Les parasites dans toutes les incubations apparaissent être déficients en équivalents réduits si ces produits terminaux proviennent de la voie catabolique classique de la fumarate réductase. Les données de cette étude et les produits terminaux retrouvés, suggèrent la présence de deux voies pour former le propanol et le propionate chez *T. colubriformis*, soit par la réduction du fumarate, soit par l'oxydation de l' $\alpha$ -cétoglutarate. *T. colubriformis*, peut répartir cet apport en carbone par ces deux voies pour maintenir une balance rédox stable. En effet, la concentration en  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}, \text{H}^+$  ou la balance rédox doivent être maintenues dans des limites raisonnables sinon les processus clés du métabolisme, comme la glycolyse, sont inhibés, provoquant un désastre dans l'organisme. Ce mécanisme semble aussi être opérationnel chez *H. contortus*. La formation d'une molécule d'acétate par l'hydrate de carbone produit deux paires d'équivalents réduits, tandis que pour la formation d'un propionate, le système fumarate réductase utilise une paire d'équivalents réduits. La production de l'éthanol par les hydrates de carbone est une balance rédox, mais, comme le propanol est plus réduit que le propionate, d'autres équivalents réduits sont exigés par la balance pour prévaloir lorsqu'il est excrété. Les sources possibles d'équivalents réduits à cette intention peuvent être :

- Le cycle de l'acide tricarboxylique
- L'oxydation des acides gras
- L'oxydation des acides aminés
- La voie des pentoses phosphates

Les sources possibles d'équivalents réduits ont été étudiées. La production d'acides aminés apparaît une voie peu probable (Barrett, 1981, *in* Sangster et Prichard, 1985), et il n'y a pas d'alanine comme produit terminal dans le liquide d'incubation. Les deux enzymes de la voie des pentoses phosphates, mesurées dans cette étude (Glucose 6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase), possèdent une faible activité. La comparaison de cette étude avec d'autres parasites, montre que les deux enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique étudiées (aconitase et isocitrate déshydrogénase) sont très actives.

Les voies de l'acide tricarboxylique et de la  $\beta$ -oxydation des acides gras semblent être les sources des équivalents réduits. La large oxydation du [ $^{14}\text{C}$ ] glucose et du [ $^{14}\text{C}$ ] palmitate en [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{CO}_2$  sous des conditions aérobies est en faveur de l'implication de ces deux voies. La voie de la  $\beta$ -oxydation semble ne devoir fonctionner que sous des conditions aérobies, mais cela est dû au besoin d'oxygène pour régénérer le FAD utilisé dans la  $\beta$ -oxydation et dans la voie de l'acide tricarboxylique par la succinate déshydrogénase. La portion de ce cycle entre le citrate et le succinyl-CoA peut fournir une source de succinyl-CoA et générer des équivalents réduits sous des conditions aérobies ou anaérobies. Le succinyl-CoA peut alors être décarboxylé en propionate. La voie conduisant du glucose au propionate en passant par la glycolyse, le cycle partiel de l'acide tricarboxylique jusqu'au succinyl-CoA (désormais intitulée la "voie de l' $\alpha$ -cétoglutarase"), et enfin la décarboxylation en propionate, produit probablement l'énergie sous forme de triphosphate pour la glycolyse et peut être pour la réaction réverse de la propionyl-CoA carboxylase ; elle peut conserver l'énergie dans la réaction de CoA transférase associée avec la formation d'un propionate par le propionyl-CoA. Dans des conditions anaérobies cette voie semble être 30% moins efficace, en terme de nucléotides triphosphates synthétisés par mole de glucose utilisé, que la voie par la fumarate réductase, mais elle permet d'accroître la flexibilité métabolique du parasite. Un calcul peut être fait sur les proportions de produits terminaux formés par les voies de l' $\alpha$ -cétoglutarase et de la fumarate réductase sous des conditions anaérobies si l'une assume la balance rédox et que les autres voies métaboliques participent faiblement à la formation d'équivalents rédox. Le catabolisme du glucose jusqu'au propionate, via la voie de l' $\alpha$ -cétoglutarate produit 5 paires d'équivalents réduits, et deux sont utilisés dans la réduction du propionate en propanol. Chaque mole d'acétate, d'éthanol, et de propionate produit par la voie de la fumarate réductase génère respectivement 2, 0, et -1 mole (perte de une mole) de  $\text{NAD(P)H, H}^+$ . Dans les souches sensibles, chez les vers traités et non-traités avec du thiabendazole, et dans les souches résistantes, chez les vers non-traités, le niveau de la somme propionate plus propanol produit sous anaérobiose par la voie de l' $\alpha$ -cétoglutarate est estimé à, respectivement, 22-23% et 23%. Lorsque les souches résistantes sont exposées au thiabendazole, la proportion de ces produits terminaux venant de cette voie, augmente à 28%. Par la voie de l' $\alpha$ -cétoglutarate, un glucose entraîne la formation d'un groupement de trois carbones et de trois  $\text{CO}_2$ . Donc, proportionnellement plus de glucose est utilisé par cette voie que le pourcentage de propionate plus propanol cité ci-dessus. Par exemple si 22% des

produits tricarbonés sont produits cela entraîne l'utilisation de 36% de glucose (et les 28% correspondent à 44% de glucose utilisé).

La sélection de vers qui peuvent contourner le système fumarate réductase, en utilisant une voie alternative, semble apparaître dans le développement de la résistance aux benzimidazoles (Sangster et Prichard, 1985). Une augmentation de la production d'éthanol, de propanol, et d'acétate dans une souche d'*H. contortus* résistante au thiabendazole a été montrée par Rew *et al.*, en 1982 (*in* Sangster et Prichard, 1985). L'utilisation importante de cycles fonctionnels entiers d'acide tricarboxylique a été aussi suggérée comme mécanisme de la résistance aux benzimidazoles chez *H. contortus* (Bennett, 1981 ; *in* Sangster et Prichard, 1985). L'exposition d'une souche résistante de *T. colubriformis* au thiabendazole sous des conditions anaérobies provoque une augmentation et une accumulation de produits terminaux, spécialement le propanol, dans le milieu d'incubation (Sangster *et al.*, 1985). La voie de l' $\alpha$ -cétoglutarate peut abaisser la dépendance du parasite pour la voie de la fumarate réductase qui est sensible au thiabendazole.

Une souche résistante de *T. colubriformis* exposée au thiabendazole sous des conditions anaérobies libère plus de propanol que lorsque le thiabendazole n'est pas présent. Ceci semble augmenter la réduction du propionate en propanol plutôt que réduire le fumarate afin de générer du  $\text{NAD(P)}^+$  lorsque le thiabendazole est présent. Cette affirmation est compatible avec le large flux par la voie de l' $\alpha$ -cétoglutarate, et l'importante production de  $\text{CO}_2$  des souches résistantes exposées au thiabendazole.

En conclusion, certains adultes de la famille des *trichostrongylidae* semblent avoir sélectionné l'activité des enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique et utilisent un cycle partiel et peut être complet lorsque la tension en oxygène le permet, comme alternative énergétique et de production d'équivalents réduits à la voie de la fumarate réductase. Cette adaptation est complétée par la production de propanol qui permet l'équilibre de la balance rédox.

La réduction du fumarate en succinate est importante dans le système de transduction des organismes anaérobies et reste l'étape terminale de la voie du phosphoénolpyruvate carboxykinase-succinate (PEPCK-succinate). L'utilisation d'*A. suum* comme modèle, a permis de mieux comprendre l'intérêt que représente cette enzyme dans le métabolisme glucidique des Nématodes.

#### 5-2-4 - Composés affectant l'intégrité cellulaire :

Les benzimidazoles empêchent la polymérisation de la tubuline, portant alors gravement atteinte à la structure cellulaire ainsi qu'à ses fonctions (Lacey *et al.*, 1990). La mitose devient impossible, entraînant une inhibition de la sécrétion, de l'assimilation, de l'absorption par les cellules épithéliales digestives. La cohérence membranaire est affectée (Sangster *et al.*, 1985). Les microtubules interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires comme le maintien de l'architecture cellulaire, la composition des parois des organites (mitochondrie), le transport intra et intercellulaire. Les benzimidazoles se lient aux dimères de tubuline et empêchent sa polymérisation (Lacey, 1990). Cette action sur les microtubules se traduit par deux effets principaux résultant d'une altération du cytosquelette cellulaire provoquée par les benzimidazoles :

- l'inhibition de la prise de glucose par les parasites en réponse aux benzimidazoles, et la perte des réserves en glycogène (Rapson *et al.*, 1981 ; *in* Beugnet, 1991).

- la réduction de la sécrétion d'acétylcholinestérase parasitaire (utile à la dégradation physiologique de l'acétylcholine sécrétée par les muqueuses digestives de l'hôte) ; cette sécrétion n'étant plus dégradée, elle provoque une paralysie spastique du ver (Rapson *et al.*, 1986 ; *in* Beugnet, 1991).

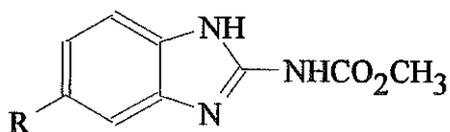
#### 5-2-4-1 - LES BENZIMIDAZOLES :

##### 5-2-4-1-1 - Chimie et pharmacocinétique :

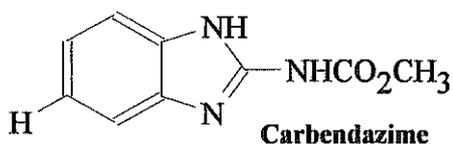
Brown *et al.*, en 1961 (*in* Lacey, 1988), ont montré l'intérêt du thiabendazole dans le traitement des helminthoses. Cette découverte est à l'origine du développement du groupe chimique des benzimidazoles, associant un cycle benzénique à un cycle imidazole (figures No. 15 et No. 16), (les nitro-imidazole ne sont pas utilisables dans le traitement antihelminthique).

**Figure No. 15 - LES CARBAMATES DE BENZIMIDAZOLES**

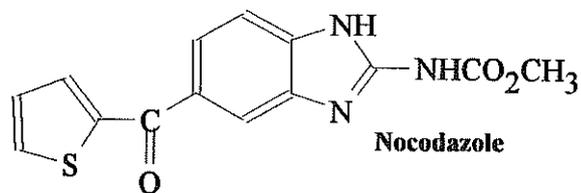
(D'après Townsend et al., 1990)



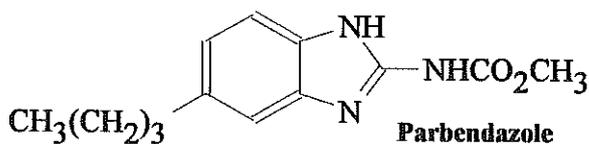
**Carbamate de benzimidazoles**



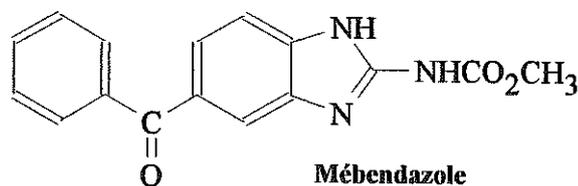
**Carbendazime**



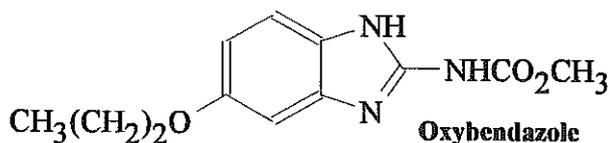
**Nocodazole**



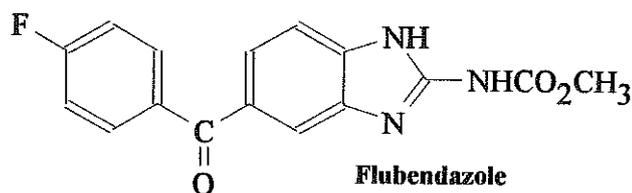
**Parbendazole**



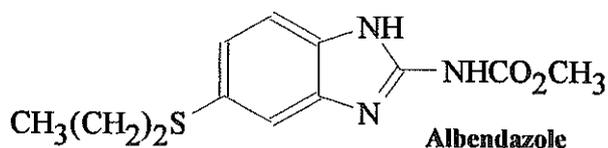
**Mébendazole**



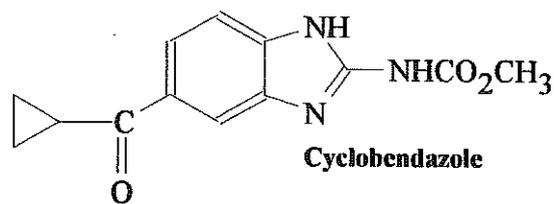
**Oxybendazole**



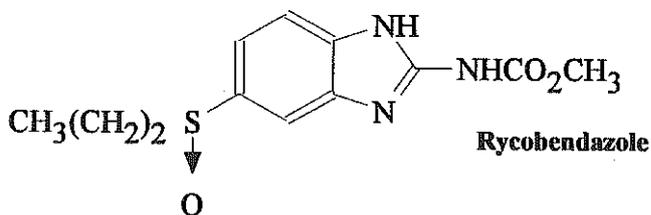
**Flubendazole**



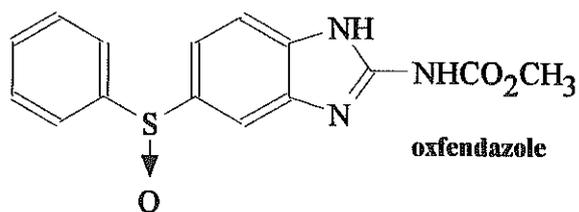
**Albendazole**



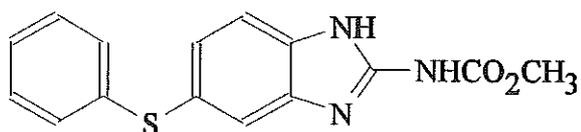
**Cyclobendazole**



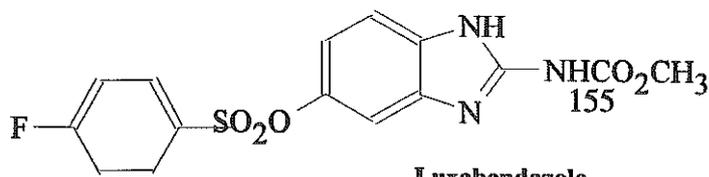
**Rycobendazole**



**oxfendazole**



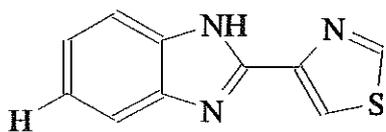
**Fenbendazole**



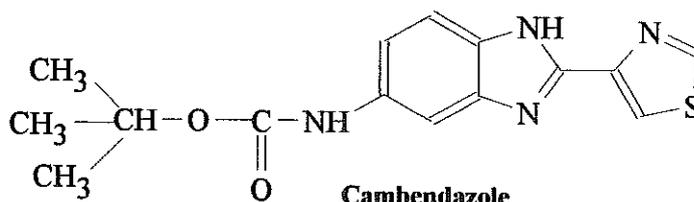
**Luxabendazole**

## Figure No. 16 - LES THIAZOLYL-BENZIMIDAZOLES

(D'après Townsend et al., 1990)

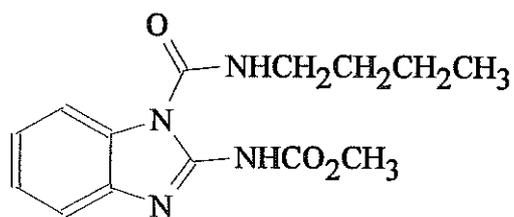


Thiabendazole

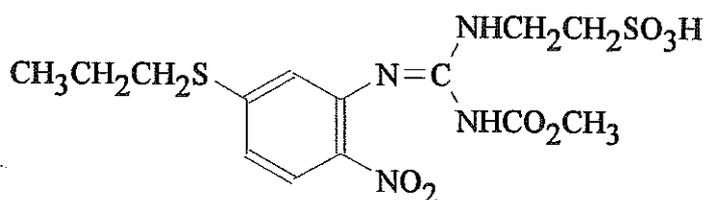


Cambendazole

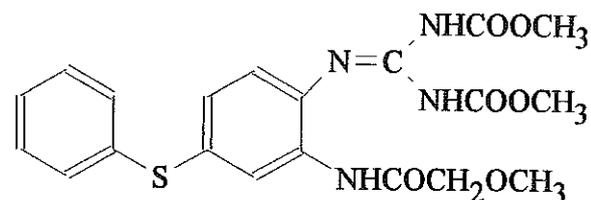
### LES PRODRUGUES



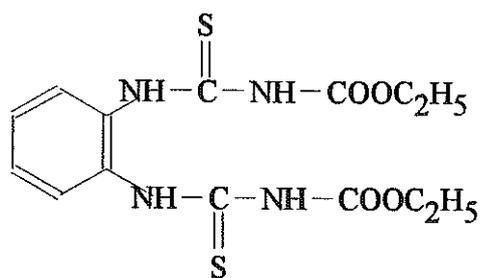
Bénomoyl



Nétobimin



Fébantel



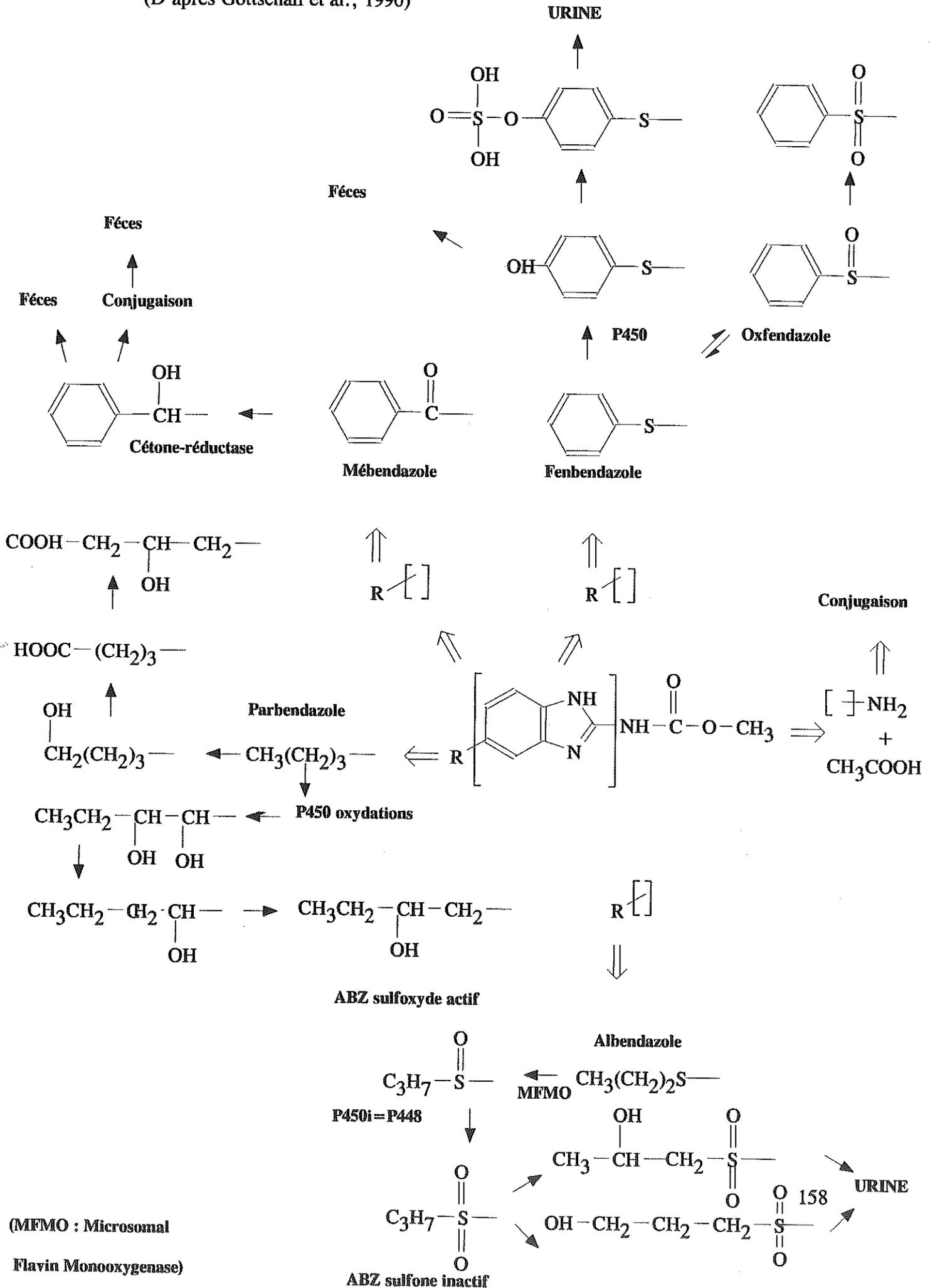
Thiophanate

La substitution du noyau benzimidazole, spécialement sur les positions 2 et 5, a permis d'obtenir de nouvelles molécules extrêmement puissantes. Les 2-carbamate-benzimidazoles sont les plus efficaces (mébendazole, flubendazole, ciclobendazole...), (figure No. 15). Ces substances étant peu résorbées au niveau intestinal, des prodrogues plus diffusibles ont été synthétisées.

Les benzimidazoles sont métabolisés de façon variable par les cytochromes P450 et les flavine-monooxygénases. Ils sont généralement métabolisés par substitution en 5, par hydroxylation, S-oxydation ou réduction. La fonction 2-carbamate pourra être décarboxylée en amine et le noyau benzimidazole directement hydroxylé. Les figures No. 17, No. 18 et No. 19 tentent de résumer le métabolisme des carbamates et prodrogues de benzimidazoles ainsi que celui des thiazolyl-benzimidazoles. Les benzimidazoles non substitués en position 5 donnent préférentiellement des métabolites urinaires 5 hydroxylés (Maugein, 1982).

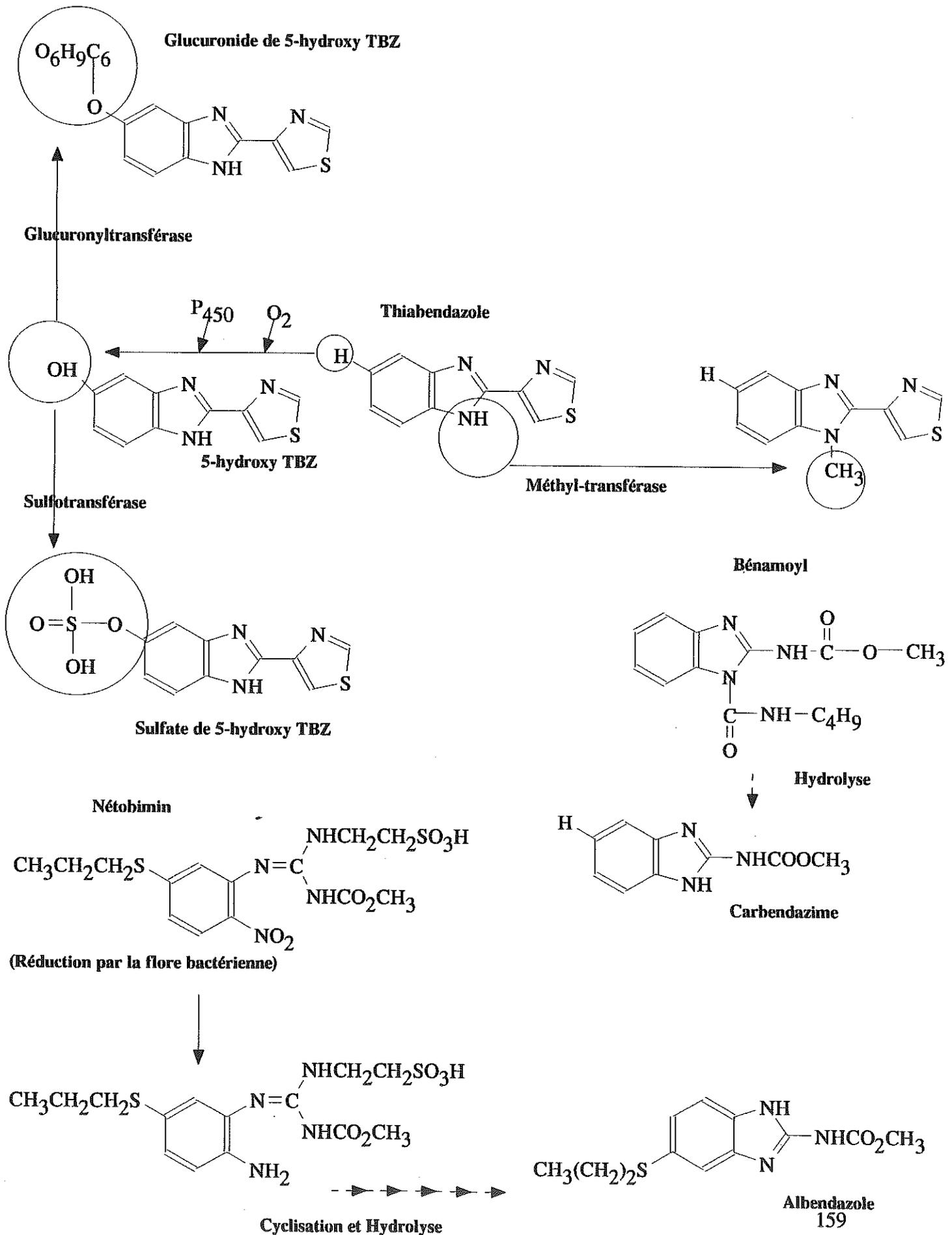
**Figure No. 17 - METABOLISME DE CERTAINS CARBAMATE DE BENZIMIDAZOLES**

(D'après Gottschall et al., 1990)



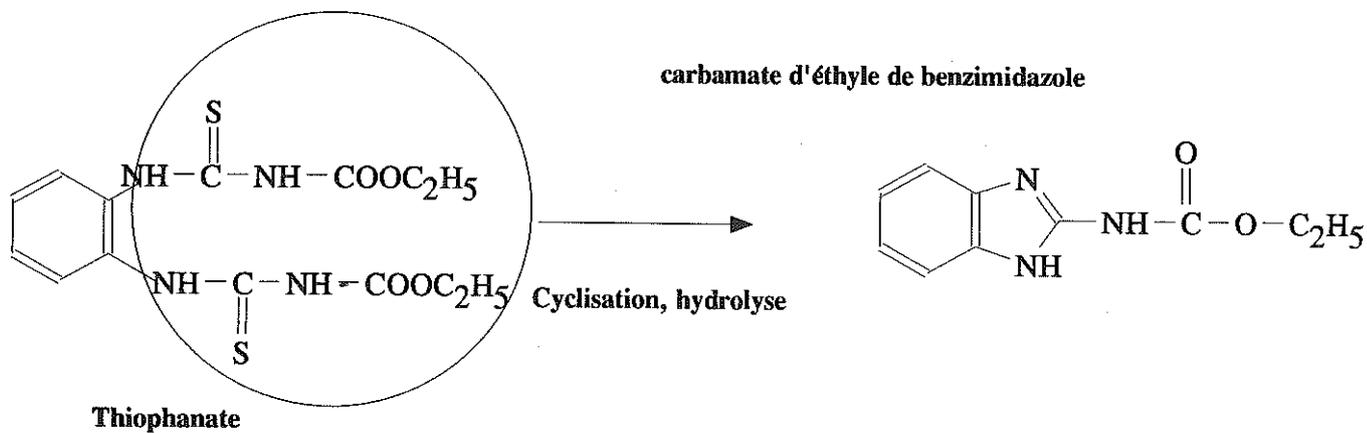
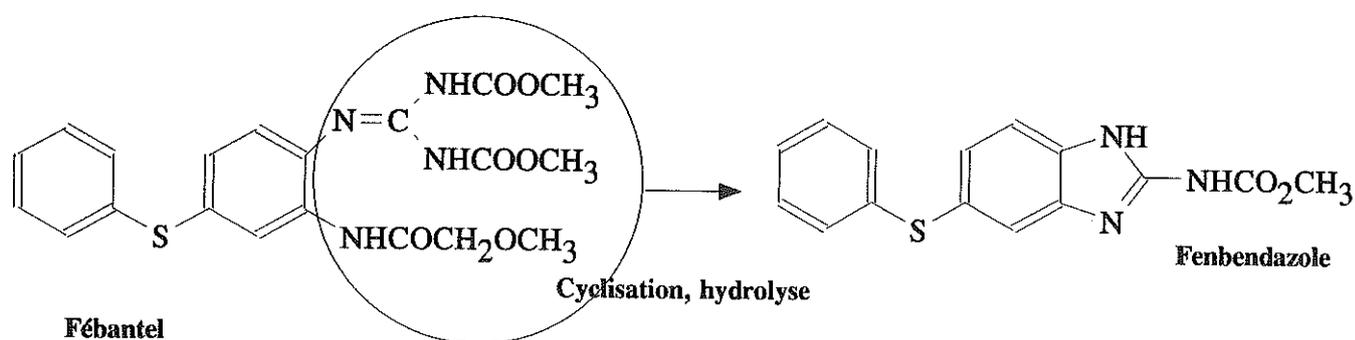
(MFMO : Microsomal  
Flavin Monooxygenase)

**Figure No. 18 - METABOLISME DES BENZIMIDAZOLES ET DES PRODRUGUES**  
**DE BENZIMIDAZOLES (D'après Gottschall et al., 1990)**



**Figure No. 19 - METABOLISME DES PRODRUGES (suite)**

(D'après Gottschall et al., 1990)



#### 5-2-4-1-2 -Les benzimidazoles en thérapeutique humaine :

##### \* LE THIABENDAZOLE :

C'est une molécule possédant un spectre large sur les helminthes et une activité antifongique intéressante. Son action sur la fumarate-réductase des helminthes est importante, en plus de l'action sur la tubuline de l'helminthe.

Sa résorption intestinale est rapide avec un pic plasmatique très précoce. Le produit est transformé en hydroxythiabendazole et éliminé en moins d'une journée par voie urinaire. Son activité est intéressante dans les capillarioses et les trichinoses (mais pas sur les formes enkystées dans les muscles). Son activité sur les ankylostomes, dans la dracunculose et les trichocéphaloses est moins intéressante (Mais il est le seul produit actif contre les formes tissulaires).

Ces effets indésirables sont ceux classiquement décrits dans le groupe, mais souvent aggravés chez l'homme. Troubles neurologiques (céphalées, vertiges, altération de la vision des couleurs), troubles psychiques, risques d'hypoglycémie, troubles cardio-vasculaires bénins (bradycardie ou hypotension) et réactions d'hypersensibilité ont été décrits. Le thiabendazole est indiqué chez l'homme essentiellement dans les anguilluloses, les larva migrans cutanée, la trichinose, et les trichostrongyloses à raison de 50 mg/kg/j pendant trois jours (sans dépasser 3 g/j), et dans les capillarioses à raison de 50 mg/kg/j pendant un mois ; dans les larva migrans cutanées, on pourra en plus utiliser la crème dermatologique. Le thiabendazole est commercialisé sous le nom de Mintezol® en comprimés de 500 mg et en suspension orale.

##### \* LE MEBENDAZOLE :

Cet antihelminthique est actif de façon large sur toutes les nématodoses intestinales, à tous les stades de développement parasitaire. Il est aussi actif sur les capillarioses et se révèle microfilaricide. Il est actif sur les larves d'*Echinococcus granulosus*, mais moins que l'albendazole. Les indications en première intention sont les nématodoses intestinales, la capillariose et l'ankylostomose.

La résorption intestinale sera faible mais potentialisée par les graisses et les repas. La demi-vie de la molécule-mère est brève (1 à 5 heures), mais le métabolisme est actif, avec hydroxylation et amination.

Les effets secondaires sont essentiellement gastro-intestinaux, mais il peut y avoir une toxicité médullaire aux fortes doses requises dans le traitement de l'hydatidose (on utilisera alors l'albendazole, moins toxique aux fortes doses). Le produit et surtout ses métabolites se sont révélés tératogènes chez l'animal. Les posologies classiques sont :

- oxyurose : 100 mg, en une prise renouvelée au bout de quinze jours.
- autres nématodoses intestinales : 200 mg/j pendant trois jours.
- capillarose : 400 mg/j pendant trois semaines.
- hydatidose : 2,4 g/j pendant un à six mois.

Les anguillules ayant leurs larves dans les tissus échappent à son action (les adultes intestinaux étant cependant tués), on préfère dans ce cas le thiabendazole.

La molécule est commercialisée sous la dénomination de Vermox<sup>®</sup> sous forme de comprimés à 100 et 500 mg et sous forme de solution orale.

#### \* LE FLUBENDAZOLE :

Ce produit reste proche du mébendazole (analogue para-fluoré) ; il possède un spectre large et est actif dans l'oxyurose, l'ascaridiose, la trichocéphalose et l'ankylostomose. Les anguilluloses font exception. Le flubendazole a été aussi essayé dans le traitement de l'onchocercose par voie intra-musculaire avec des résultats positifs. La résorption intestinale est faible. Les effets secondaires prendront la forme de nausées, douleurs digestives, diarrhées passagères... La grossesse est une contre-indication théorique et le produit ne s'est pas révélé tératogène chez l'animal. La posologie sera, pour l'oxyurose, de 100 mg en prise unique renouvelable au bout de trois semaines. Pour les autres parasitoses sensibles on administrera 100 mg<sup>~</sup> matin et soir pendant trois jours consécutifs. La spécialité est le Fluvermal<sup>®</sup> en comprimés dosés à 100 mg et en soluté buvable.

#### \* L'ALBENDAZOLE :

C'est le composé possédant le spectre le plus large, incluant les formes larvaires et adultes des Nématodes, les formes adultes de Cestodes et Trématodes. Il est ovocide et larvicide vis-à-vis de *N. americanus*, ovocide contre *A. duodenale*, *A. lumbricoïdes* et *T. trichiura*. Il induit une dégénérescence intestinale et tégumentaire des helminthes et bloque la résorption du glucose, entraînant une déplétion en glycogène et une diminution de la formation d'ATP. L'albendazole est rapidement métabolisé avec production d'un catabolite

sulfoxydé également actif. Ce métabolisme particulier est lié à la présence d'un hétéroatome de soufre dans la chaîne latérale de la molécule. La cinétique de cette molécule est extrêmement fluctuante suivant les sujets, compte-tenu de cette biotransformation et de la variabilité de résorption. Le dérivé sulfoxydé sera lui-même transformé en subissant hydroxylation et hydrolyse. La demi-vie d'élimination de la molécule mère est d'environ huit heures. L'état d'équilibre sera globalement atteint après 2 à 4 jours de traitement. Les effets indésirables sont là aussi d'ordre gastro-intestinal, avec, en plus, altération des tests hépatiques, de rares hyperthermies en début de traitement, et quelques cas de leucocytopénies. L'albendazole sera formellement contre-indiqué en cas de grossesse car sa tératogénicité est importante, ainsi qu'en cas d'insuffisance hépatique grave et de troubles hématologiques. La spécialité se dénomme Zentel<sup>®</sup>, comprimés dosés à 200 mg. La posologie est de 400 mg en prise unique pour l'ascaridiose, de 600 à 800 mg/j pendant un à trois jours pour la trichocéphalose et de 600 mg/j pendant un mois, en cures renouvelées après une quinzaine de jours dans l'hydatidose.

**5-2-4-1-3 - Les benzimidazoles en thérapeutique vétérinaire:**

**(Tableau No. 4)**

**Tableau No. 4 - Les prodrogues et les benzimidazoles antihelminthiques dans leur utilisation vétérinaire. (D'après Campbell, 1990)**

Molécule	Noms commerciaux	Animal cible	Dose efficace en (mg/kg)
Albendazole (SmithKline)	Valbazen <sup>®</sup> , Zentel <sup>®</sup> , Proftril <sup>®</sup>	Bovins Ovins	7,5-10 5
Cambendazole (Merck)	Bovicam <sup>®</sup> , Camvet <sup>®</sup>	Bovins Ovins Porcins Equins	25 20 20 20
Fébanel (Bayer)	Rintel <sup>®</sup> , Vercom <sup>®</sup> (ass.), Combotel <sup>®</sup> (ass.)	Bovins Ovins Porcins Equins	7,5 5 16 (X 2 pour les Ascarides) 32 dans la nourriture
Fenbendazole (Hoechst)	Panacur <sup>®</sup> , Safe-Guard <sup>®</sup> , Axipur <sup>®</sup>	Bovins Ovins Porcins Equins Chiens Chats	7,5 5 5 dans la nourriture 5 (x 2 pour les Ascarides) 50 x 3 jours 20 x 5 jours
Flubendazole (Janssen)	Flubenol <sup>®</sup> , Flumoxal <sup>®</sup> , Flutelmium <sup>®</sup> , Biovermin <sup>®</sup>	Bovins Porcins Volailles Equins	10 x 2 à 5 jours 4 dans la nourriture - 10 x 2 à 5 jours
Mébandazole (Janssen)	Vermox <sup>®</sup> , Telmin <sup>®</sup> , Teimintic <sup>®</sup> , Supaverm <sup>®</sup> , TelminB <sup>®</sup> , Multispec Bolus <sup>®</sup> , Mébenvet <sup>®</sup>	Bovins Ovins Equins Volailles Chiens Chats	- 15 8,8 - 22 x 3 jours 6-50
Néobolmin (Schering Plough)	Hapadox <sup>®</sup> , Hapsail <sup>®</sup>	Bovins Ovins Porcins	7,5-20 7,5-20 9
Oxfendazole (Cooper/Syntex)	Synanthic <sup>®</sup> , Benzemina <sup>®</sup> , Systemex <sup>®</sup> , Autoworm <sup>®</sup>	Bovins Ovins Equins Chiens	4,5 5 10 10 x 3 jours
Oxibendazole (SmithKline)	Anthécide EQ <sup>®</sup> , Equitac <sup>®</sup> , Equipar <sup>®</sup> , Filaribita Plus <sup>®</sup> (ass.)	Bovins Ovins Equins Chiens	10 10 10 5 / jours
Parbendazole (SmithKline)	Helmatac <sup>®</sup> , Worm Guard <sup>®</sup>	Bovins Ovins Porcins	20-30 20 32
Ricobendazole (Robert Young)	Bental <sup>®</sup> , Rycoben <sup>®</sup>	Bovins Ovins	7,5 5
Thiabendazole (Merck)	Thibenzole <sup>®</sup> , Equizole TBZ <sup>®</sup> , Equivet-Tz <sup>®</sup>	Bovins Ovins Equins Porcins	66-110 (Doses supérieures pour les vers pulmonaires) 44-66 (doses supérieures pour les vers pulmonaires, les larves en arrêt, et <i>Nematodirus helvetianus</i> ) 44-50 (doses supérieures pour les vers pulmonaires, les larves en arrêt, et <i>Nematodirus helvetianus</i> ) 50

## A) Espèces parasitaires et hôtes concernées :

### A-1) Les bovins :

Bien que développé originellement pour le contrôle des nématodoses gastro-intestinales, certains membres de la classe sont actifs contre les stades matures ou immatures extraintestinaux de *Dictyocaulus sp.* En général les benzimidazoles sont largement actifs contre *Trichuris sp.* chez les ruminants. Ils sont absorbés par le tractus intestinal et, après un passage par le foie, les drogues, ou leurs métabolites, retournent au rumen (par le sang) et à l'intestin grêle (par la bile et le sang). Le niveau d'absorption et d'excrétion varie énormément en fonction de la drogue, avec une lente absorption et un recyclage prolongé entre le tissu entéral et parentéral, semblant augmenter l'efficacité. Les composés les plus récents comme l'oxfendazole, le fenbendazole, l'albendazole semblent posséder une bonne activité aussi bien sur les stades larvaires en arrêt que sur les larves en développement et les adultes. Cette dernière activité reste liée à leur lente absorption par le tractus gastro-intestinal (Campbell, 1990), (Tableau No. 5).

En général, les benzimidazoles sont actifs contre les espèces de Nématodes suivantes :

*Haemonchus placei*, *O. ostertagi*, *Trichostrongylus axei*, *Bunostomum phlebotomum*, *Nematodirus helvetianus*, *Cooperia punctata*, *Cooperia oncophora*, *T. colubriformis*, *Oesophagostomum radiatum*, *Dictyocaulus viviparus*.

### A-2) Les ovins et caprins :

Les benzimidazoles de la première génération sont efficaces contre les larves en arrêt si le dosage est augmenté, et si le traitement est divisé et donné sur plusieurs jours (Tableau No. 5). Les Nématodes répondant habituellement bien au traitement sont :

*H. contortus*, *Ostertagia sp.*, *T. axei*, *Cooperia sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Nematodirus sp.*, *Bunostomum trigonocephalum*, *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum colombianum*, *Oesophagostomum venulosum*, *Strongyloides papillosus*, *Dictyocaulus filaria*.

En général, les mêmes produits sont utilisés pour les caprins, bien que les dosages utilisés soient approximativement égaux à ceux des ovins.

### A-3) Les porcins :

Pour des raisons de facilité aussi bien que d'efficacité démontrée, les composés sont administrés aux porcs dans l'alimentation. De nombreux composés sont actifs contre les adultes d'*A. suum*, *Hyostrogylus rubidus* et *Oesophagostomum sp.*. La dernière génération est active contre les adultes de *Trichuris suis*, et les stades immatures de nombreuses espèces (Tableau No. 6).

### A-4) Les équins :

Pour démontrer une bonne efficacité sur les *Ascarididea* comme *P. equorum* et sur les *Rhabdiasidea* comme *Strongyloïdes westeri*, certains benzimidazoles doivent être administrés à des doses élevées. Plusieurs espèces de petits strongles sont groupées ensemble pour l'évaluation de leur sensibilité, et démontre une grande sensibilité aux benzimidazoles. Cependant, les stades immatures à localisation tissulaire sont moins sensibles que les localisations dans la lumière intestinale. Le traitement est le plus souvent administré dans l'alimentation (Tableau No. 7). Les espèces sensibles sont :

*P. equorum*, *Strongylus edentus*, *Strongylus equinus*, *Strongylus vulgaris*, *Cylicocycclus sp.*, *Gyalocephalus sp.*, *Poteriostomum sp.*, *Trichonema sp.*, *Cyathostomum sp.*, *Cylicostephanus sp.*, *Triodontophorus sp.*, *Oxyuris equi*.

### A-5) Les Chiens :

Les benzimidazoles doivent être administrés au chien quotidiennement et pour plusieurs jours pour atteindre des résultats satisfaisant (Campbell, 1990). L'oxibendazole (5 mg/kg), le mébendazole (22 mg/kg), le fenbendazole (50 mg/kg) sont utilisés contre les *Strongylidea* comme *Uncinaria stenocephala*, et *Ancylostoma caninum*, contre les *Ascarididea* comme *Toxocara canis*, et *Toxascaris leonina*, et contre les *Trichuridea*, comme *Trichuris vulpis*.

### A-6) Les volailles :

Les benzimidazoles ne sont pas utilisés extensivement pour les volailles, excepté le mébendazole qui semble être remplacé par le flubendazole, ce dernier étant plus efficace et moins toxique. Les deux sont à administrer quotidiennement et durant une ou deux semaines.



#### **A-7) Parasites autres que les Nématodes :**

Certains benzimidazoles sont actifs contre les plathelminthes. Le cambendazole, le fébantel, l'oxfendazole et le fenbendazole sont tous actifs sur *Moniezia sp.*, l'albendazole est actif sur *Moniezia sp.*, et à plus forts dosages sur *Fasciola* ; la prodrogue : le nétobimin, est active contre *Moniezia sp.*, et *Dicrocoelium* et à forts dosages, contre la forme adulte de *Fasciola* ; le flubendazole est actif contre *Railletina cestitillus* ; l'oxfendazole contre *Taenia pisiformis* et autres *Taenia sp.*

#### **B) Importance du mode d'administration :**

Les benzimidazoles sont le plus souvent administrés en prise unique orale. Ils sont sur le marché depuis une trentaine d'années pour certains, et un grand développement des formulations a vu le jour. Une alternative à cette prise orale est l'incorporation du composé dans des tablettes d'alimentation, permettant l'ingestion d'une petite quantité de produit sur une longue période de pâturage. Une approche plus récente, consiste en l'utilisation de seringues spéciales pour l'injection de la drogue directement dans le rumen du bovin, ainsi que le développement de dispositifs diffuseurs introduits dans le rumen par la bouche et relargant le composé de manière filée ou intermittente sur une période prolongée. Le principal intérêt de ces dispositifs est la réduction du temps de travail associé au traitement d'un grand nombre d'animaux.

Les injecteurs intrarumen, développés sur les bovins, sont composés d'une seringue en plastique dans laquelle un poussoir permet d'enfoncer l'aiguille à travers la peau et injecte une dose d'oxfendazole dans la cavité ruminale. C'est une forme de thérapie dose-unique et elle reste plus entérale que parentérale en dépit de la non délivrance par la bouche. Le volume d'antihelminthiques peut être ajusté pour s'assurer que la dose délivrée est convenable pour les différentes catégorie de poids des animaux. Les autres dispositifs intraruminaux, sont délivrés par la bouche et retenus dans le rumen ou plus exactement dans le réticule adjacent du rumen. Certains, utilisés pour les bovins, délivre de l'oxfendazole en pools espacés d'approximativement trois semaines, sur une période de quatre mois. Ce dispositif utilise le principe de la corrosion galvanisée (électrisée au moyen d'une pile)

continue d'une tige en alliage de magnésium, exposant périodiquement une tablette annulaire d'oxfendazole au fluide intraruminal. Un diffuseur a aussi été développé pour la libération périodique d'albendazole chez les bovins. Dans ce cas, les pools délivrés, sont contrôlés par un système électronique alimenté par des petites batteries alcalines. Ce mécanisme permet alors une libération "contrôlée par gaz" d'un pool mensuel d'albendazole sur une période de trois mois (trois traitements). Chez le mouton, une libération non-pulsatile est permise grâce à un système qui délivre de l'albendazole continuellement sur une période de trois mois. La drogue est délivrée par une capsule introduite dans le rumen par un pistolet oral spécial. Des ailettes de plastique sont fixées dans le rumen pour maintenir la capsule en place, et un ressort métallique pousse successivement six tablettes d'albendazole vers l'ouverture de la capsule, où elles sont exposées au fluide ruminal (Campbell, 1990).

### **C) Rôle des diffuseurs à visée prophylactique dans l'apparition des résistances :**

La sélection de résistance par les diffuseurs utilisés dans la prophylaxie médicale des strongyloses digestives vétérinaires a été étudié par Waller, en 1989 (*in* Beugnet, 1991). Il existe deux types de diffuseur : les diffuseurs à relargage par dissolution et les diffuseurs à libération continue par diffusion. Les diffuseurs par dissolution d'antihelminthiques possèdent en général un faible effet de queue. Le principe actif s'élimine brutalement, entraînant moins de risque de sélection de résistance. Par contre, les diffuseurs à libération continue par diffusion pourraient sélectionner des résistances et les fabricants cherchent à permettre la disparition rapide du produit après son temps d'action. Pour les ovins, les bolus sont utilisés pour les animaux en première année de pâture et exercent surtout leur action sur les larves infectantes de première infestation. Les diffuseurs prophylactiques agissent à dose larvicide sur les larves infectantes. L'effet de queue au bout des trois mois de rémanence pourrait alors entraîner une sélection sur ces larves de première infestation, vierges de tout contact avec un antihelminthique. Il ne faut pas confondre les diffuseurs à visée prophylactique avec les procédés thérapeutiques à libération discontinue de doses actives sur les adultes. Ces procédés diminuent les manipulations effectuées sur les animaux. Par le fait qu'ils représentent des traitements ponctuels réalisés selon une fréquence élevée, ils peuvent induire des résistances (Beugnet, 1991). Le Jambre *et al.* en 1981 étudie l'efficacité de l'oxfendazole administré en dose unique ou avec des capsules à libération prolongée contre des souches résistantes aux

benzimidazoles d'*H. contortus*, *O. circumcincta* et *T. colubriformis*. Une administration prolongée d'oxfendazole par un dispositif de délivrance intraruminal semble efficace à la fois contre les souches sensibles et résistantes des parasites précités. Le premier effet observé avec l'oxfendazole en capsules à libération contrôlée, sur les souches résistantes, est une baisse du pourcentage d'oeufs se développant jusqu'au troisième stade larvaire. Puis une baisse du nombre d'oeufs et de vers suit. Mais Le Jambre admet que ce procédé peut sélectionner une résistance et insiste sur l'importance du taux d'antihelminthique libéré et de la période de libération dans la phase initiale de sélection de résistance lorsque les individus sont sensibles ou légèrement résistants. Les capsules à libération contrôlée sont des dispositifs de dissolution qui délivrent lentement un antihelminthique sur une centaine de jours (Anderson, 1985, *in* Martin P.J., 1990). Si la fréquence des gènes de résistance est basse, le dispositif peut atteindre un contrôle parasitaire efficace et ne pas plus sélectionner de résistance que le traitement oral. Cependant, le dispositif contient un antihelminthique benzimidazolé pour lequel la résistance en prise unique orale est largement répandue. Deux remarques importantes sont à prendre en compte :

- premièrement, la capsule est inefficace contre les vers résidents résistants
- deuxièmement, bien qu'elle possède un effet sur les larves entrantes (sensibles), quelques unes survivent (Anderson *et al.*, 1988, *in* Martin P.J., 1990).

De ces études d'efficacité, il apparait que la capsule ne représente pas un grand rôle dans la gestion des résistances. Cependant, il a aussi été montré que la capsule peut représenter une option très efficace dans le contrôle des Nématodes chez le mouton en dépit du fait que les vers sont résistants à des doses thérapeutiques d'un benzimidazole administré oralement (Barger, 1988, *in* Martin P.J., 1990). Alternativement, si le niveau de délivrance exerce une distinction en faveur d'individus résistants hétérozygotes, la persistance de la délivrance résulte en un changement dans la sélection qui produit un bond important dans la tolérance conférée par un gène unique apparenté à celui de la résistance aux insecticides.

#### 5-2-4-1-4 - Mode d'action des benzimidazoles et résistance:

##### A) Le rôle de la tubuline dans le mode d'action et les mécanismes de résistance des benzimidazoles :

L'introduction des benzimidazoles comme antihelminthiques date de 1961 (Brown *et al.*, 1961 ; *in* Lacey, 1988). Des recherches intenses au cours des années 60 et 70 aboutirent à la découverte de nombreux composés ou prodrogues benzimidazolés à caractère antihelminthique. La découverte de l'action des benzimidazoles sur la tubuline parasitaire (Borger et De Nollin, 1975 ; *in* Lacey, 1988) permit alors de nouveaux champs d'investigation des mécanismes d'action et de résistance aux benzimidazoles chez le parasite.

##### A-1) Les microtubules :

Le terme de "microtubule" date de 1961.

##### A-1-1) Structure des microtubules :

Comme son nom le suggère, les microtubules sont des organelles creux et tubulaires, de 15 nm de diamètre interne, de 25 nm de diamètre externe et de longueur variable. En microscopie électronique, un microtubule est composé d'une série de 13 protofilaments (chez les mammifères) (Dustin *et al.*, 1984 ; *in* Lacey, 1988). Chez les Nématodes, les protofilaments sont en moyenne, au nombre de 11 (15 sur *C. elegans* par Chalfie et Thompson, 1979, et 12 sur *Ascaridia galli* et *T. colubriformis* par Davis et Gull, 1983 ; *in* Lacey, 1988). Le microtubule est en équilibre dynamique entre une addition et une soustraction sur le côté opposé d'unités de tubuline soluble. *In vitro*, le changement d'énergie nécessaire pour perturber cette équilibre peut être fourni par une variation de température entre 0°C (désassemblage) et 37°C (assemblage). La concentration critique de tubuline permettant l'assemblage n'est pas un facteur invariable mais dépend du type de tubuline et des caractéristiques des milieux *in vitro* utilisés (système tampon, pH, concentrations ioniques, co-facteurs et pureté). En se désassemblant, le microtubule se dissocie en dimères de tubuline avec une concentration variable d'oligomères. Ces oligomères de tubuline sont essentiels pour l'initiation de l'assemblage *in vitro*. Le dimère est composé d' $\alpha$  et  $\beta$

tubulines, protéines de poids moléculaire 50000, et respectivement de 450 et 445 acides aminés (pour la tubuline cérébrale de porc). L'homologie de structure entre les protéines est supérieure à 40%, elles sont toutes les deux fortement acides (40% des 30 résidus COOH terminaux acides), (Ponstingl *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988). La différenciation de l' $\alpha$  et de la  $\beta$  tubuline est réalisée par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) après réduction ; dérivation et un poids moléculaire respectivement de 55000 et 53000 semble plus juste que celui calculé (50000). Des techniques d'isoélectrofocalisation permettent d'isoler des isotubulines microhétérogènes ( $\alpha_1, \alpha_2 \dots$  et  $\beta_1, \beta_2 \dots$ ) (Wolf *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988). Des protéolyses limitées par la trypsine, la chymotrypsine et diverses protéases montrent que les deux tubulines possèdent deux sous-unités majeures liées ensemble par une séquence accessible aux protéases. De plus lorsque le dimère d' $\alpha$  et de  $\beta$  tubuline se trouve séparé d'un fragment clivé par la subtilisine (tubuline-S), le dimère-S possède une concentration critique pour la polymérisation de 0,1 mg/ml (2 mg/ml pour la tubuline) (Bhattacharyya *et al.*, 1985 ; *in* Lacey, 1988).

#### A-1-2 - Co-facteurs endogènes :

La modification de l'équilibre tubuline-microtubule *in vivo* n'est pas clairement dépendante des variations de température mais est régulée par de nombreux co-facteurs endogènes qui contrôlent l'état de dimérisation de la tubuline par l'intermédiaire d'une concentration critique de polymérisation.

La découverte de l'exigence en nucléotides, comme le GTP, pour l'assemblage et la stabilité de la tubuline native, reste fondamentale. Le dimère de tubuline contient deux sites liant le GTP dénommés, l'un le site E (Echangeable), l'autre le site N (Non-échangeable), ces dénominations reflétant leur affinité pour le GTP exogène. L'exigence en GTP apparaît essentielle pour toutes les tubulines indépendamment de l'espèce et semble issue de l'évolution d'un domaine stable de liaison dans la tubuline. Le GTP peut être substitué par d'autres analogue du GTP ainsi que par d'autres nucléotides comme l'ATP, l'UTP et le CTP (ces derniers possédant toutefois une plus faible affinité), (Penningroth et Kirschner, 1977, 1978 ; *in* Lacey, 1988). Le site E lié au GTP est incorporé dans la microtubule en croissance, le GTP est ultérieurement hydrolysé en GDP (activité GTPase). Cette activité GTPasique est modulée par les inhibiteurs de la microtubule (Lin *et al.*, 1981 ; *in* Lacey,

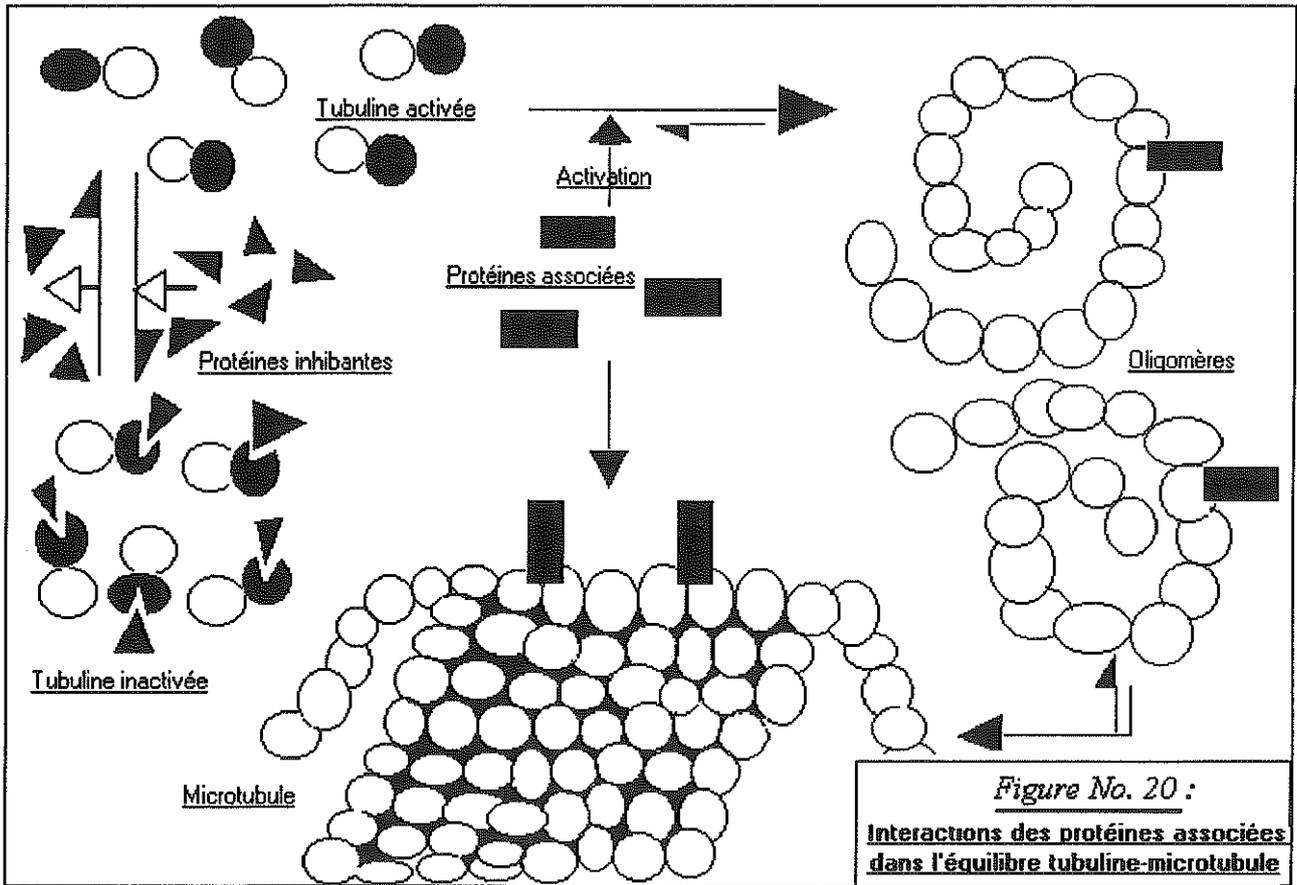
1988). Cependant l'efficacité d'analogues du GTP non hydrolysables suggère que l'activité GTPasique n'est pas indispensable au processus de polymérisation (Penningroth *et al.*, 1978 ; *in* Lacey, 1988). *In vitro* le rôle du GTP dans la polymérisation peut être dépassé en utilisant des réactifs stabilisant la microtubule non sélectifs comme le glycérol et le sucrose (Shelanski *et al.*, 1973). Des études de marquage par photo-affinité du GTP montrent que le site E est localisé sur la  $\beta$ -tubuline (Hesse *et al.*, 1985, Nath *et al.*, 1986 ; *in* Lacey, 1988). L' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline possèdent toutes les deux des groupements riches en glycine sur les résidus 140-146, compatibles avec les régions liant le phosphate d'autres protéine liant les nucléotides (Ponstingl *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988). Le modèle le plus général de ces deux sites comprend l'entortillement de quatre boucles entre des feuillets plissés  $\beta$  et des hélices  $\alpha$ , englobant les résidus d'acides aminés de 60 à 300 (Sternlicht *et al.*, 1987 ; *in* Lacey, 1988).

La tubuline contient également des sites isolés de haute affinité pour le calcium et le magnésium. *In vitro*, ces ions montrent une activité opposée ; le magnésium est utile pour l'assemblage tandis que le calcium libre ou complexé avec la calmoduline (protéine liant le calcium de poids moléculaire de 14000), inhibe l'assemblage et induit le désassemblage. Des hydrolyses limitées par la subtilisine, la trypsine et la chymotrypsine permirent d'isoler le site de haute affinité du calcium sur la terminaison COOH de l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline (Serrano *et al.*, 1986, *in* Lacey, 1988). Le site de liaison du magnésium semble proche du site au GTP (Correia *et al.*, 1987). D'autres cations comme le zinc, le cobalt, le manganèse, l'ammonium quaternaire, le sodium, le potassium et le lithium, ainsi que de nombreux anions, altèrent la dynamique et la stabilité de la formation de la microtubule *in vitro*, cependant de telles modulations ne semblent pas être en rapport avec une modulation endogène *in vivo*.

### A-1-3) Régulation par des protéines n'appartenant pas à la tubuline :

De nombreuses protéines interagissent avec la tubuline ou la microtubule. La majorité de ces protéines sont regroupées sous le terme de MAPs ou "Microtubule-Associated Proteins" et agissent en stabilisant la formation microtubulaire en se liant à la tubuline pour former le composé soluble oligomère (figure No. 20). La caractérisation des interactions des MAPs *in vivo* et *in vitro* par des techniques biochimiques et immunologiques, implique l'hypothèse de la spécificité fonctionnelle de ces protéines vis-à-vis des microtubules. De nombreuses protéines inhibitrices ont été identifiées (Tableau No. 8). Dans ce groupe, certaines protéines montrent un pouvoir inhibiteur direct sur la liaison de la colchicine marquée (Lockwood, 1978 ; Sherline *et al.*, 1979 ; Gupta et Gupta, 1984 ; *in* Lacey, 1988), tandis que d'autres protéines montrent une action indirecte en induisant des changements conformationnels de la drogue (Fellous *et al.*, 1985).

Les MAPs et les protéines tau semblent se lier sur la partie COOH-terminale de la  $\beta$ -tubuline entre les résidus 392-445, et particulièrement sur la région heptapeptide 434-440. Une faible interaction des protéines tau mais pas des MAPs apparaît sur les séquences parallèle  $\alpha$  (Littauer *et al.*, 1986 ; *in* Lacey, 1988). Ces protéines étant caractérisées chez les mammifères, la nature des MAPs ou des autres protéines se liant à la tubuline est peu connue chez les eucaryotes invertébrés comme les Nématodes.



**Tableau No. 8 - Protéines associées à l'équilibre tubuline-microtubule.**  
(d'après Lacey, 1988)

Protéine	Source	Poids mol.	Action	Référence
MAP1 a,b,c MAP2 a,b,c	Neurone Neurone	350000 280000	Stabilise microtubules et oligomères	Vallee <i>et al.</i> , 1986
MAP3 a,b* MAP4	Neurone Neurone et non-Neurone	180000 215000	Idem	Matus <i>et al.</i> , 1986  Olmsted <i>et al.</i> , 1986
MAP5*	Neurone	320000		
Tau	Neurone primitif  Non-neurone	55 à 68000  42000 125000 200000	Idem  Réaction croisée avec les anticorps tau	Binder <i>et al.</i> , 1986  Drubin <i>et al.</i> , 1986
TAP (tubulin Assembly Protein)	Cellules CHO (Chinese Hamster Ovary cells)	68000	Facteur d'elongation de la tubuline	Lockwood, 1978
Chartines	Neurone et non-neurone	64 à 80000	non-caractérisée	Magendantz <i>et al.</i> , 1985
CSFs (Cold Stabilizing Factors)	Neurone	35000, 64000, 67000.	Induit la stabilité du microtubule au froid	Margolis <i>et al.</i> , 1981, Pirollet, 1986
STOP	Neurone	145000	Semblable aux CSFs	Margolis <i>et al.</i> , 1986
Protéine 250K  Facteurs de liaison à la tubuline- 1,2,3	Neurone  Neurone	250000  < 4000, 10 à 15000, 25 à 40000	Inhibe la liaison de la colchicine (CLC) et la polymérisation	Sherline <i>et al.</i> , 1979  Lockwood, 1978
P1,P2	Cellules CHO	70000	Module la liaison de la CLC	Gupta <i>et al.</i> , 1984
Protéine 33K	Neurone	33000	Inhibe la polymérisation et induit une dépolymérisation partielle	Kotani <i>et al.</i> , 1984
Substance P	Neurone	1000	inhibe la polymérisation par liaison au COOH- terminal	Maccioni <i>et al.</i> , 1986

#### A-1-4) Rôle des microtubules dans la cellule :

De nombreuses fonctions sont attribuées aux microtubules dans les mécanismes cellulaires comme :

- la formation du fuseau mitotique dans la cellule en division.
- la maintenance de la conformation cellulaire.
- la sécrétion cellulaire.
- l'absorption de nutriments.
- le transport intracellulaire.

L'association intracellulaire de la tubuline ou des microtubules implique d'autres organelles comme les mitochondries, l'appareil de Golgi, les ribosomes, les membranes cellulaires et bien-sûr le noyau (Dustin, 1984 ; *in* Lacey, 1988). C'est par ces interactions et l'association directe de la tubuline et des microtubules, avec les mécanismes physiologiques des hormones, des neurotransmetteurs, des nutriments, des enzymes et des récepteurs, que les réponses cellulaires à l'inhibition des microtubules se manifestent. La rupture de l'équilibre tubuline-microtubule peut entraîner une cascade de changements biochimiques et physiologiques directes et indirectes aboutissant à la perte de l'homéostasie cellulaire. Si les conditions de ce déséquilibre sont maintenues, elles sont alors létales. La létalité est plus importante sur la cellule en division ou en croissance. Les études du rôle cellulaire des microtubules, sont lourdement dépendantes de l'utilisation de sondes pharmacologiques fonctionnant, d'une part comme inhibiteurs comme, la podophyllotoxine, la vinblastine et la colchicine et d'autre part comme non-inhibiteurs, comme la lumicolchicine, la colchicine et l'isocolchicine. L'utilisation de cette approche est fondée sur deux postulats :

- les drogues agissent seulement sur l'inhibition des microtubules.
- les activités *in vitro* sur les microtubules reflètent la nature et l'étendue de l'interaction drogue-tubuline affectant des fonctions cellulaires particulières *in vivo*.

## A-2) Pharmacologie de la tubuline cérébrale de mammifères :

### A-2-1) Les inhibiteurs non-sélectifs des microtubules :

Les inhibiteurs des microtubules peuvent être largement divisés par leur interaction sélective ou non-sélective avec la tubuline en comparaison avec d'autres protéines. Les inhibiteurs non-sélectifs provoquent de nombreux effets cellulaires caractéristiques de l'inhibition microtubulaire comme l'arrêt en métaphase, l'inhibition de la croissance cellulaire et de la polymérisation *in vitro*, et dans certains cas de la liaison des ligands tritiés. Mais ils montrent aussi une activité contre de nombreuses autres protéines à des concentrations comparables. Ces composés sont représentés par les agents alkylants, les agents acylants, les thiols, les ions métalliques lourds, les organométaux, les aldéhydes ou les cétones et les quinones. Typiquement, de tels ligands sont aussi reconnus en tant que substrats pour des substitutions nucléophiles par les groupements thiols, amines et hydroxyles des acides aminés comme la cystéine, la lysine, le tryptophane, et la sérine qui sont impliqués dans la polymérisation de la tubuline.

Un second groupe, moins bien défini, d'inhibiteurs non-sélectifs est constitué par des composés basiques. L'affinité des amines pour la tubuline est bien établie, cependant, il n'est pas expliqué si elles agissent sur des sites définis analogues à ceux des MAPs dans des résidus acides. *In vitro*, les polyamines comme la polylysine ou d'autres macromolécules basiques miment l'action des MAPs, soit en réduisant la concentration critique de polymérisation et en stabilisant la croissance microtubulaire, soit en induisant un désassemblage rapide des microtubules et l'assemblage de la tubuline (Lee *et al.*, 1978 ; *in* Lacey, 1988). Ce dernier effet est aussi observé avec des antibiotiques comme les aminosides, la néomycine, la viomycine, la streptomycine, la gentamycine et la kanamycine à des concentrations de l'ordre de la millimole (Akiyama *et al.*, 1978 ; *in* Lacey, 1988). Les études chromatographiques de Kocha *et al.*, en 1986 (*in* Lacey, 1988), suggèrent la présence d'un domaine de liaison hydrophobe sur la tubuline. Ils démontrent ceci en utilisant de la colchicine, son dérivé inactif la lumicolchicine et une variété de ligands hydrophobes non-apparentés (naphtyle, diphénylméthyle, triméthoxyphényle, phényle), la tubuline étant adsorbée dans le gel de la matrice. Avec pour exception la colchicine, ces ligands ne montrent aucune activité sur la polymérisation et le déplacement de la liaison de ligands

tritiés, à des concentrations inférieures à 100 micromoles. L'existence d'un domaine potentiellement hydrophobe est aussi suggérée par l'interaction de ligands polyaromatiques comme le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) et le bis-(8-anilino naphthalène-1-sulphonate) (bis ANS) et semble une voie d'explication pour la liaison, dans des sites distincts de ceux de la colchicine et du taxol, de composés connus pour posséder une large activité inhibitrice microtubulaire comme le gossypol, la daunomycine, l'actinomycine D, la rifampicine, les oestrogènes, et les progestérones.

*In vitro*, les effets de la réponse cellulaire à l'inhibition microtubulaire sont généralement caractérisés par de fortes concentrations de composés ( $> 50 \mu\text{M}$ ), une stoechiométrie multiple, un marquage isotopique dispersé à la fois sur la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  et l'absence d'une relation structure activité définie.

#### A-2-2) Inhibiteurs sélectifs des microtubules :

Trois sites pharmacologiques ont été définies par des méthodologies variées et sont dénommés en fonction de l'inhibiteur prototype comme respectivement les sites de la colchicine, du taxol, et de la vinblastine. Les sites de la colchicine et de la vinblastine sont présents sur le dimère de tubuline, tandis que le taxol se lie surtout sur un site microtubulaire avec seulement des interactions vestigiales avec le dimère.

##### A-2-2-1) Le site de liaison de la vinblastine :

La vinblastine est un alcaloïde de la pervenche (*Vinca rose* L.) utilisé cliniquement comme anticancéreux (figure No. 21), c'est le prototype de la classe des indoles isolées des alcaloïdes de la pervenche, d'origine à la fois naturelle ou semi-synthétique. La vinblastine et les autres alcaloïdes de la pervenche inhibent la polymérisation de la tubuline à des concentrations de 0,5 à 5  $\mu\text{M}$  *in vitro*, induisant alors la formation d'agrégats en spirales et de paracristsaux à de fortes concentrations (Zavala *et al.*, 1978 ; *in* Lacey, 1988). La liaison de la vinblastine tritiée est rapide, atteignant un équilibre en 15 minutes, et réversible avec un liaison du ligand facilement dissociable. La constante d'association ( $K_a$ ) de la vinblastine est fortement variable et de l'ordre de 0,16 à 45  $\mu\text{M}^{-1}$ , dépendant de la méthodologie et de la source de tubuline. La maytansine (MTS), un macrolide isolé des genres *Maytenus* et

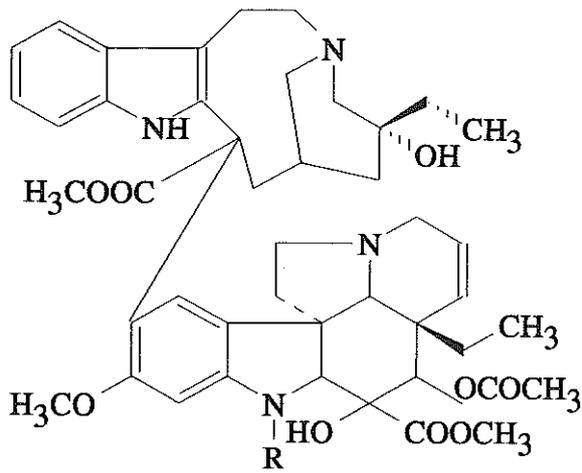
*Putterlichia*, est le maytasinoïde inhibiteur des microtubules le mieux étudié. C'est un inhibiteur compétitif de la liaison de la vinblastine tritiée et de la vincristine et il montre une réversibilité de liaison et une dépendance à la force ionique et à la température similaire.

Un troisième classe distincte d'inhibiteurs, les hexapeptides phomopsinoïdes cycliques isolés de l'agent causal du lupinosis, *Phomopsis leptostromiformis*, inhibent aussi la liaison de la vinblastine tritiée (Lacey *et al.*, 1987 ; *in* Lacey, 1988). La phomopsine A et B et les dérivés semi-synthétique, phomopsinamine et octahydrophomopsine, sont les plus puissants inhibiteurs de la polymérisation microtubulaires actuellement connus.

Plus récemment, un autre inhibiteur, la rhizoxine, une cétone macrocyclique isolée du champignon *Rhizopus chinensis*, l'agent pathogène du pourrissement de la semence du riz, a démontré une activité inhibitrice sur la polymérisation des microtubules par liaison sur le site de la vinblastine (Takahashi *et al.*, 1987 ; *in* Lacey, 1988).

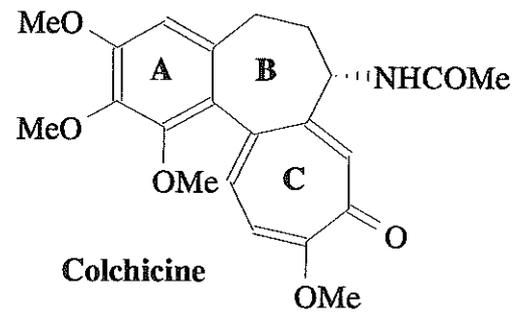
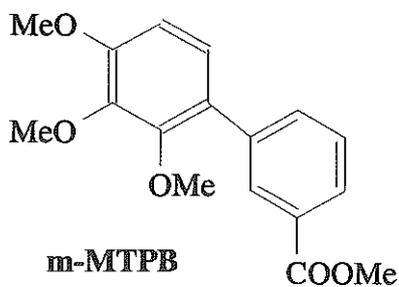
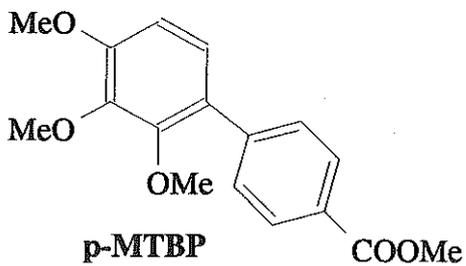
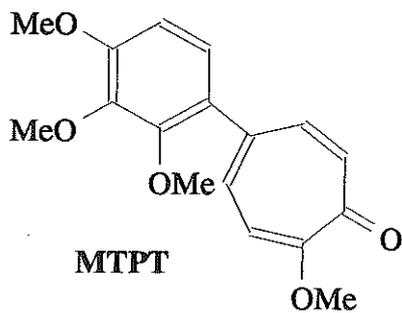
Le site de la vinblastine est connu pour induire certains changements dans le site de la colchicine (Lacey *et al.*, 1987), dans le site du GTP (Huang *et al.*, 1985 ; *in* Lacey, 1988), dans le site du *Bis*-ANS et les régions de liaison des protéines MAP et Tau (Ludueno *et al.*, 1986, *in* Lacey, 1988). Malgré l'importance de ce site dans l'activité tubulaire, son existence n'est retrouvée que chez les mammifères et les échinodermes. Aucune étude sur la présence d'un site de la vinblastine chez les helminthes n'a été publiée.

**Figure No. 21 - STRUCTURE DE CERTAINS LIGANDS DES SITES DE LA TUBULINE**

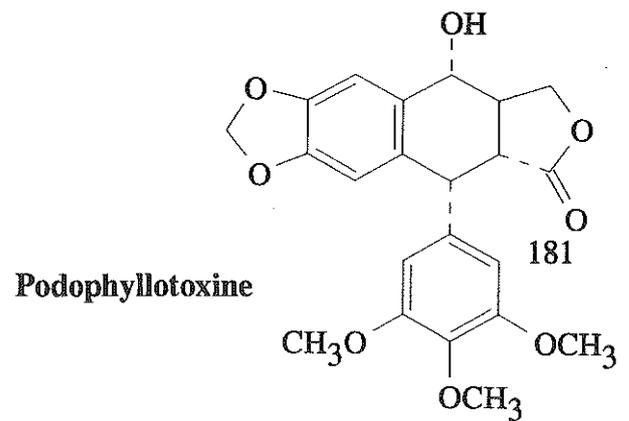
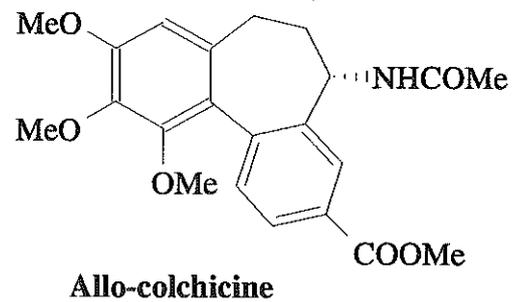
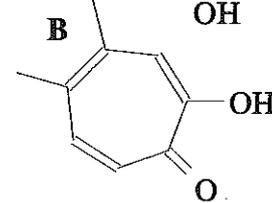
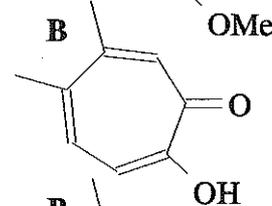
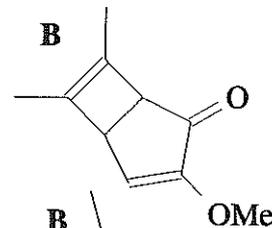


R = CH<sub>3</sub> Vinblastine

R = CHO Vincristine



**Structures partielles des cycles C**



#### A-2-2-2) Site du taxol :

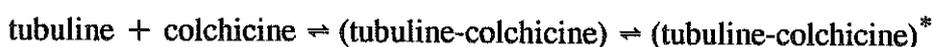
Le taxol est un produit naturel issu de l'if (*Taxus brevifolia*). L'action du taxol comme inhibiteur des microtubules est particulière par le fait qu'elle induit une polymérisation de la tubuline, augmentant alors la vitesse et la production des microtubules par polymérisation avec de la tubuline active (envers les MAPs) et inactive, et réduisant effectivement la concentration critique d'assemblage de plus de 20 fois (Horwitz *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988). Cette action rend possible l'isolement des microtubules de la source précédemment obtenue, seulement après de longs processus d'isolement. Le taxol tritié se lie aux microtubules seulement lorsque la stoechiométrie est égale à 0,6-0,8 mole par mole de dimère de tubuline. Le site de liaison semble être distinct de celui de la colchicine, de la vinblastine, du calcium et du GTP. A cause de la nature complexe de la rupture de l'équilibre tubuline-microtubule par la liaison du taxol, l'emplacement précis du site est encore inconnu.

#### A-2-2-3) Site de liaison de la colchicine :

##### *La colchicine.*

- La colchicine est un alcaloïde tricyclique acétylé, originellement isolé de la colchique (*Colchicum autumnale*), le système tricyclique étant dénomé A, B, C (figure No. 21). La colchicine se lie à la tubuline cérébrale de mammifère avec une haute affinité et une stoechiométrie de 1:1. Ce maximum est seulement observé sous des conditions d'équilibre de liaison avec une stoechiométrie sous non-équilibre variant entre 0,5 à 0,8 mole de colchicine par mole de tubuline. La liaison est lente avec un temps d'équilibre supérieur à quatre heures, une grande dépendance à la température (optimum à 37°C) puisqu'aucune liaison n'est observée à 4°C. La complexation de la colchicine avec la tubuline donne une interaction "serrée" qui ne se dissocie pas facilement et est souvent comparée à une liaison pseudo-irréversible. Ce complexe peut être dissocié par l'emploi de solvant d'extraction et les détergeants en induisant une dénaturation de la tubuline, prouvant ainsi la non-covalence. Le site de liaison de la colchicine sur la tubuline n'est pas stable et se détruit avec une cinétique d'ordre 1. La stabilisation du dépérissement du site peut être atteinte par l'addition de vinblastine (ou ligands du site de la vinblastine), de GTP, de ligands du site de la

colchicine, et de colchicine elle-même (Wilson, 1975 ; *in* Lacey, 1988). La formation du complexe colchicine-tubuline entraîne une augmentation de la fluorescence intrinsèque de la colchicine ( $\times 150$ ) avec un maximum entre 430 à 440 nm (Bhattacharyya et Wolff, 1974 ; *in* lacey, 1988). Ce phénomène est spécifique à la colchicine ainsi qu'à l'isomère inactif, l'isocolchicine (**figure No. 21**), montrant une augmentation de la fluorescence de seulement 3% par rapport à la colchicine. Cette fluorescence serait due à l'immobilisation de la molécule dans le site de liaison et le groupement méthoxytropone serait largement impliqué. La formation du complexe est aussi associée à divers changements dans l'accessibilité des sites modifiés des protéases, la réactivité des résidus cystéinyl, l'activité GTPasique, la reconnaissance des anticorps, et le spectre de résonance paramagnétique électronique. Ces derniers changements, ainsi que la fluorescence impliquent un changement de conformation de la colchicine et de la tubuline durant l'interaction. La cinétique de la formation du complexe, implique au minimum un changement conformationnel colchicine-induit de la tubuline en deux étapes : (\*) = conformation active



La réaction initiale est rapide conduisant à la formation d'un complexe réversible qui supporte un lent changement de conformation de la tubuline, colchicine-induit, pour donner le complexe terminal. L'étape finale semble responsable de la pseudo-irréversibilité de la liaison de la colchicine observée (Garland, 1978 ; *in* Lacey, 1988).

Des études de la relation structure-activité ont été entreprises, ainsi, par exemple :

- La modification du cycle C par hydrolyse de la colchicine ou la photodécomposition de la  $\beta$  et  $\gamma$ -lumicolchicine (**figure No. 21**), abolissent l'activité (Wilson, 1975 ; Rösner *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988).

- Un renversement des positions des groupement méthoxy et cétone, comme c'est le cas pour l'isocolchicine (**figure No. 21**), la suppression du groupement méthoxy et l'hydrogénation de la double liaison du cycle C (pré-colchicine), aboutissent aussi à une perte d'activité.

- Le remplacement du groupement méthoxy par un groupe méthylthio permet une légère amélioration de la puissance, cependant, l'augmentation de la taille par ce dernier groupement (thiocolchicine) réduit l'activité (Shiau *et al.*, 1976 ; *in* Lacey, 1988).

- L'ammoniolysé de la colchicine, conduisant à l'aminotropone, la colchicéinamide,

maintient l'activité (Zweig et Chignell, 1973 ; *in* Lacey, 1988).

- L'inversion de l'activité optique (-) en (+) du groupement acétamido en 7 de la colchicine du cycle B abolit l'activité. Cela semble être dû à un changement de conformation des cycles phényltropolone A-C de la configuration prédominante S à R (Yeh *et al.*, 1988 ; *in* Lacey, 1988).

- La suppression du groupement acétamido pour donner le cycle B non-substitué, maintient l'activité inhibitrice sur les microtubules, comme le fait l'introduction d'une double liaison sur ce cycle (Rösner *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988), cependant la substitution avec d'autres amides et carbamates donne des effets variables.

- Pour les acétamides substitués, l'inhibition de la liaison de la colchicine tritiée et l'activité antitumorale, sont améliorées (Rösner *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988).

- Sur le cycle A, l'hydrolyse du groupement méthoxy conduit à une réduction de l'activité, tandis que la présence de sucre soluble dans l'eau sur la position 4 (colchicoside) conduit à la perte de l'activité (Rösner *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988).

La relation structure-activité des analogues de la colchicine peut être comparée à un modèle hydrophobe, où le plus d'effets structurellement spécifiques, conduisant à la perte d'activité, sont liés au cycle C. Fitzgerald, en 1976 (*in* Lacey, 1988), montre que la tropolone peut être modifiée sans perte d'activité et que le cycle B n'est pas essentiel pour l'activité (en utilisant l'allo-colchicine, possédant le cycle B et le MTPT, un analogue de la colchicine ayant perdu le cycle B), (figure No. 21). Des études ultérieures rapportent la perte de l'importance du cycle B dans l'inhibition mais montrent que sa présence confère le caractère pseudo-irréversible de la liaison de la colchicine (Bane *et al.*, 1984 ; *in* Lacey, 1988). Lacey, en 1988, synthétise une série de dérivés A-C de l'allo-colchicine. Les phénylbenzoates substitués par un méthyle en 4 (p-MTPB) (figure No. 21) sont seulement de faibles inhibiteurs des microtubules, tandis que les phénylbenzoates substitués en 3 (mMTPB), montrent une activité puissante (figure No. 21).

L'hypothèse affirmant que le rôle du cycle B dans l'inhibition est atteint par un alignement stéréochimique optimal des cycles A-C, est fondée mais cet alignement est essentiel pour certains composés comme les 4-phénylbenzoates, et non-nécessaire pour d'autres comme le MTPT.

Enfin le site de la colchicine n'est pas proche des sites du GTP E, du  $Mg^{2+}$ , du  $Ca^{2+}$ , des MAPs ou de la vinblastine, mais une série d'interactions complexes semble exister

entre ces sites et celui de la colchicine.

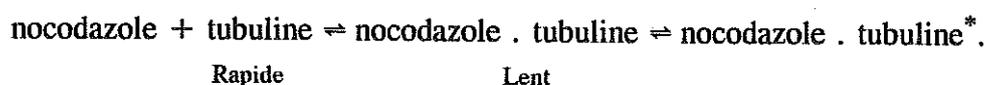
### *Les podophyllotoxines*

- Elles sont issues de *Podophyllum peltatum* et inhibent la polymérisation par liaison au site de la colchicine (figure No. 21). Bien qu'étant un inhibiteur compétitif de la liaison de la colchicine, l'interaction podophyllotoxine-tubuline est différente car librement réversible, aboutissant rapidement à un équilibre (< 30 mn), et réalisable à 4°C (Cortese *et al.*, 1977 ; *in* Lacey, 1988). Si de nombreuses similitudes sont observables avec la colchicine, quelques différences sont à décrire. L'isomérisation de la lactone *trans* en lactone *cis* (picropodophylline) ou la suppression du carbonyle pour donner un furanne (anhydropodophyllol), résultent en une perte d'activité (de facteur 10), tandis que l'ouverture du cycle pour donner à la fois les acides *cis* ou *trans* abolit l'activité pour les deux (*in* Lacey, 1988). Avec une exception pour le groupement lactone et les groupements polaires volumineux, une grande tolérance de changements dans les structures est admise pour les analogues de la podophyllotoxine. La stéganacine, un autre ligand proche de la podophyllotoxine et isolée de *Steganotaenia araliaca*, inhibe aussi la polymérisation par liaison sur le site de la colchicine (Zavala *et al.*, 1980 ; *in* Lacey, 1988).

### *Les benzimidazoles*

- L'implication des benzimidazoles dans l'inhibition des microtubules a été décrite pour la première fois, dans une étude sur le mode d'action de la prodrogue, le bénomyl et son principe actif le carbénazim chez le champignon (Clemons et Sisler, 1971 ; *in* Lacey, 1988). Ces données furent confirmées par des observations cytologiques et par analogie avec d'autres inhibiteurs connus des microtubules. Les études cytologiques sur des lignées cellulaires de mammifères, sur les rats avec le carbénazim et le bénomyl (Styles et Garner, 1974 ; *in* Lacey, 1988) et sur le Nématode *A. suum* (Borgers et De Nollin, 1975) confirment les actions antimitotiques et inhibitrices des microtubules. Cependant, dans les études comparant l'action du carbénazim à celles de la colchicine ou de la vinblastine, le carbénazim semble le seul à inhiber largement la polymérisation de la tubuline sur un surnageant brut de cerveau de mammifère. La première mise en évidence biochimique de la puissance d'inhibition des microtubules par les benzimidazoles, est relatée pour le nocodazole en utilisant de la tubuline purifiée de cerveau de rat. L'I<sub>50</sub> (concentration requise pour inhiber

la polymérisation de 50%) pour la polymérisation de 0,63  $\mu\text{M}$  démontre que le nocodazole est plus puissant que la colchicine et la podophyllotoxine. Sous équilibre de dialyse, la liaison du nocodazole à la tubuline est rapide, avec une température optimale de 25°C, une stoechiométrie de 1:1 et la liaison est complètement inhibée par la colchicine (Hoebeke *et al.*, 1976 ; *in* Lacey, 1988). L'inhibition *in vitro* de la polymérisation de la tubuline de cerveau de bovin par des carbamates de benzimidazoles, ainsi que le thiabendazole et le cambendazole, démontre une valeur de l' $I_{50}$  de 2 à 550  $\mu\text{M}$  (Tableau No. 9), calculée par réduction du degré de polymérisation. Les premières études de relation structure activité, confirment, à la fois l'activité supérieure du groupement carbamoylé en 2 par rapport au thiazole et l'importance du substituant en 5 (ou 6), (les benzimidazoles sont tautomères lorsqu'ils sont substitués sur le cycle aromatique ; les deux tautomères indiscernables formés sont normalement notés 5 ou 6) pour une puissante inhibition (Friedman et Platzer, 1978 ; *in* Lacey, 1988). Des investigations détaillées de l'interaction nocodazole-tubuline par des méthodologies sous équilibre et non-équilibre, montrent une stoechiométrie 2:1 se déroulant par l'intermédiaire de deux mécanismes, analogues à la colchicine, avec une composante initiale rapide suivie d'une phase lente (Head *et al.*, 1985 ; *in* Lacey, 1988) :



Contrairement à la colchicine, cette interaction est librement réversible.

**Tableau No. 9 - Activité des benzimidazoles comme inhibiteurs de la tubuline parasitaire et de mammifère\*** (D'après Lacey, 1988).

Drogue	Mammifère			%Inh	Parasite		
	I <sub>50</sub> (Poly)	DL <sub>50</sub> (L1210)	CI <sub>50</sub> (CLC)		CI <sub>50</sub> (MBZ)	DE <sub>50</sub> (Oeufs)	DL <sub>50</sub> (Larves)
Carbénazim	71	2 à 7	-	NI	5,0	7,6	0,094
Parben(.)	3,1	nt	-	36	0,30	0,33	0,014
Oxiben(.)	2,2	0,15	-	37	0,30	nt	nt
Alben(.)	6,9	nt	-	13	0,21	0,38	0,034
Rycoben(.)	NI 100	nt	nt	37	2,3	NI 100	1,6
Cicloben(.)	5,5	nt	-	88	1,4	8,5	0,24
Mében(.)	6,1	0,31	6,3	90	0,19	4,1	0,048
Noco(.)	2,1	0,07	4,5	40	0,12	19	0,038
Fluben(.)	3,5	nt	-	18	0,17	nt	nt
Fenben(.)	5,4	0,47	-	33	0,18	NI 10	0,019
Oxfen(.)	NI 100	11,3	-	-	1,3	NI 100	0,57
Luxaben(.)	-	nt	-	-	0,30	nt	nt
Thiaben(.)	549	nt	nt	-	5,5	0,33	< à 0,04
Camben(.)	64,2	nt	nt	-	0,54	nt	nt

(.) = .dazole ; nt = non testé

\* Toutes les données sont exprimées en  $\mu\text{M}$ .

I<sub>50</sub> (poly) = concentration requise pour inhiber la polymérisation de 50%, d'après Lacey *et al.*, 1985, sauf pour le ciclo bendazole (Lacey, 1982), le thiabendazole et le cambendazole (Friedman *et al.*, 1978).

DL<sub>50</sub> (L1210) = concentration requise pour inhiber la croissance des cellules leucémiques L1210 de 50% (Lacey *et al.*, 1985).

CI<sub>50</sub> (CLC) = concentration d'inhibiteur requise pour inhiber la liaison de la colchicine tritiée (1 $\mu\text{M}$ ) à la tubuline cérébrale de mouton de 50%, et le % d'inhibition étant observé à concentration de saturation (200  $\mu\text{M}$ ) - (De nombreux benzimidazoles étant seulement solubles jusqu'à 10-20 $\mu\text{M}$ ) - (Lacey *et al.*, 1988).

CI<sub>50</sub> (MBZ) = Inhibition de la liaison du mébendazole tritié par pré-incubation de l'inhibiteur, suivie de l'addition du mébendazole tritié, à un extrait tubulaire brut de L3 d'*H. contortus* (Lacey *et al.*, 1988).

DE<sub>50</sub> (Oeufs), DL<sub>50</sub> (larves) = Inhibition du développement des oeufs ou des larves d'*H. contortus*. Les oeufs sont isolés des fécès et incubés sur agar contenant des concentrations croissantes d'inhibiteurs. Après 7 jours le nombre d'oeufs, L1, L2 ou L3 est comptés et les données utilisées pour trouver les valeurs de la DE<sub>50</sub> et DL<sub>50</sub> (Lacey, 1988).

Les effets de modification structurale de la molécule mère, le carbénazim, sur l'activité inhibitrice microtubulaire sont les suivants (figure No. 22) :

- La présence d'un groupement carbamate ( $\text{NHCOOCH}_2\text{R}$ ) sur la position 2 est essentielle pour une activité puissante.

- Indépendamment du substituant en 5, le remplacement par un amide ( $\text{NHCOCH}_2\text{R}$ ) réduit l'activité d'un facteur 10, tandis que l'hydrolyse de l'amine abolit l'activité.

- L'augmentation de la taille du carbamate passant du méthyle à l'éthyle améliore de 1,2 à 2 fois l'activité. Cependant, l'augmentation aux propyl, butyl, et pentylcarbamate réduit progressivement l'activité.

- Pour tous les substituants en 5 où la variation du carbamate était entreprise, le carbamate d'isopropyl reste le plus puissant (Lacey, 1982 ; *in* Lacey, 1988).

- L'alkylation de la position 1, réduit aussi l'activité de 10 à 20 fois.

- Le remplacement du groupement  $-\text{NH}-$  par un  $-\text{S}-$  ou  $-\text{O}-$  pour former respectivement des benzothiazoles et des benzoxazoles, abolit l'activité inhibitrice.

- Une monosubstitution en 4 ou 7 confère une faible activité, restant approximativement 20 à 50 fois moins active que l'isomère 5. Cependant, l'introduction d'un substituant en 4 (ou 7), dans un carbamate de benzimidazole substitué en 5 et actif (mais pas dans un inactif), produit une légère amélioration de l'activité.

- Avec une exception pour l'analogue diméthyle, la disubstitution en 5,6 réduit ou abolit l'activité.

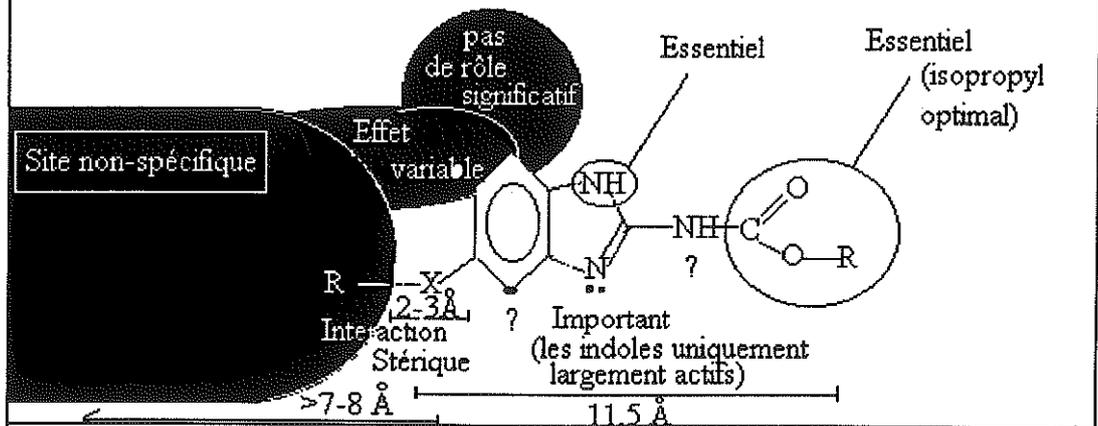
Dans la série des carbamates de benzimidazole substitués en 5 (les plus actifs), l'inhibition maximale de la polymérisation de la tubuline se situait entre 0,7 et 4  $\mu\text{M}$  pour à la fois les substituants aliphatiques et aromatiques. Cette activité est dépendante de la taille du substituant, cependant pour les substituants aromatiques comme les groupements phénylthio (fenbendazole) et phénoxy, la substitution du cycle module l'activité. Indépendamment de la taille du substituant, l'activité est lourdement dépendante de la nature du groupement adjacent au benzimidazole. Pour les substituants branchés (isopropyl, *t*-butyl) ou polaires ( $-\text{CHOH}-$ ,  $\text{SO}$ ,  $\text{SO}_2$ ), l'activité est soit réduite, soit abolie. Ces observations suggèrent avec d'autres études, que la géométrie et la polarité de la région adjacente de 2 à 3 Å au benzimidazole joue un rôle majeur dans l'interaction avec la tubuline. Ces limitations sont importantes dans la définition d'une variabilité structurale compatible avec la liaison du carbamate de benzimidazole et des substituants en 5 dans leur domaine respectif, jouant alors

le rôle de pont. Le potentiel d'inhibition des benzimidazoles contre la polymérisation de la tubuline de mammifère est fortement en concordance avec la  $DL_{50}$  sur la croissance des cellules leucémiques L1210, impliquant le fait que la tubuline est le seul site d'action de l'inhibition de la croissance cellulaire (Lacey et Watson, 1985 ; *in* Lacey, 1988).

#### *Autres inhibiteurs du site de la colchicine*

- La griséofulvine et le carbamate d'isopropylphényle (IPC) (figure No. 22) sont aussi reconnus comme inhibiteurs des microtubules et semblent se lier au site de la colchicine. Le tubulozole, un carbamate plus complexe inhibe aussi la polymérisation tubulaire. La stéréochimie du tubulozole représente un sonde unique pour l'investigation des mécanismes dépendant des microtubules par le fait que l'isomère *cis* est un inhibiteur actif tandis que le *trans* est essentiellement inactif (Van Ginckel *et al.*, 1984 ; *in* Lacey, 1988). Cette interaction offre de considérables avantages sur d'autres sondes actives/inactives comme colchicine/lumicolchicine et colchicine/isocolchicine, puisque les tubulozoles sont stables, solubles dans l'eau, et possèdent un identité chimique et un comportement cinétique très voisin. Le carbamate de déazadihydroptéridine, chimiquement proche du méthotrexate est un des nombreux composés montrant une activité antitumorale. Dans le noyau déazadihydroptéridine, des modifications comme une aromatisation, une dérivation de  $-NH_2$ , ou l'inclusion de bioisostères de  $-NH-$  comme  $-S-$ ,  $-O-$ ,  $-CH_2-$ , réduisent ou abolissent les activités d'inhibition *in vitro*, de la polymérisation et de la liaison de la colchicine tritiée, que possèdent les déazadihydroptéridines. La combrétastatine et la roténone ont été aussi décrites comme inhibitrices.

**Figure No. 22 - Relation structure-activité des carbamates de benzimidazole (LACEY, 1988) pour une activité inhibitrice optimale sur les microtubules.**



### A-3) Pharmacologie de l'action des benzimidazoles chez les helminthes :

#### A-3-1) Aspects généraux *in vivo* de la pharmacologie des benzimidazoles :

L'efficacité *in vivo* des benzimidazoles a été étudiée cliniquement sur de nombreuses helminthoses et sur des hôtes animaux variés. L'efficacité de ces benzimidazoles se définit comme suit :

Abréviations utilisées : PBZ = parabendazole ; OBZ = oxybendazole ; ABZ = albendazole ; RBZ = rycobendazole ; MBZ = mébendazole ; FBZ = fenbendazole ; OFZ = oxfendazole ; TBZ = thiabendazole ; CBZ = cambendazole

- 1 - l'efficacité des benzimidazoles (en mg/kg) basée sur des études *in vivo* montre un ordre d'efficacité de :

TBZ < CBZ < PBZ < OBZ < MBZ < FBZ ~ ABZ ~ OFZ ~ RBZ.

Pour les Nématodes gastro-intestinaux, les doses communes sont de 44 à 5 mg/kg, chez le mouton, de 66-100 à 4,5 mg/kg, chez la chèvre, 88-100 à 6 mg/kg, chez le cheval et 50 à 4 mg/kg chez le porc (Marriner et Armour, 1986 ; *in* Lacey, 1988).

- 2 - Les doses requises pour une complète efficacité contre les Nématodes sont plus basses que celles utilisées contre les Cestodes et les Trématodes. Dans la dernière classe le contrôle est généralement obtenu à fortes doses et en de multiples traitements (Van den Bossche et al., 1982 ; *in* Lacey, 1988).

- 3 - Les parasites extra-intestinaux, particulièrement ceux à localisation intravasculaire et intersticielle, sont moins sensibles que les parasites gastrointestinaux (Van den Bossche *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988).

- 4 - L'activité sur les stades en développement est supérieure à celle contre les stades arrêtés et adultes (sur habitats comparables). Deux exemples sont représentés par :

\* (1) le développement des oeufs des parasites gastrointestinaux (*in vivo* et *in vitro*), l'éclosion et le développement larvaire sont inhibés à des doses qui sont sous-efficaces

contre l'adulte *in vivo* (Kirsch et Schleich, 1982 ; *in* Lacey, 1988), et

\* (2), les Nématodes comme les filaires intersticielles, telle *Onchocerca gibsoni*, en montrant un contrôle sur les microfilaires en absence d'efficacité sur les adultes (Forsyth *et al.*, 1984 ; *in* Lacey, 1988). Paradoxalement, des exemples de stades en développement restant relativement insensibles sous des conditions de contrôle des adultes sont connus chez *F. hepatica* (Boray, 1986 ; *in* Lacey, 1988). Différences sans doute expliquées par un habitat variable entre la forme en développement et la forme adulte.

- 5 - D'autres remarques sont importantes. En effet, la toxicité sur l'hôte est faible à des doses efficaces d'antihelminthiques. Cependant des effets secondaires transitoires à des doses élevées ou chroniques sont décrits :

\* (1) la dose létale 50 % est généralement multipliée par 5 à 20 fois par rapport aux doses usuelles.

\* (2) les doses efficaces de benzimidazoles sont hôte-dépendantes, suite aux différentes clairances et dynamiques des drogues *in vivo* (Van den Bossche *et al.*, 1985 ; *in* Lacey, 1988).

\* (3) Les benzimidazoles sont intensivement métabolisés chez les espèces hôtes. Le chemin et le degré de métabolisme de chaque benzimidazole sont similaires pour tous les hôtes. Le premier passage hépatique par les enzymes solubles du foie (réductases et oxydases) constitue une voie rapide de désactivation de nombreux benzimidazoles notamment le mébendazole, le parabendazole, et l'albendazole.

\* (4) En dépit des premières études indiquant une faible absorption systémique après administration orale *in vivo*, des données ultérieures montrent une absorption supérieure à 50%. Une biodisponibilité faible est généralement trouvée en l'absence de données sur l'excrétion biliaire. Pour la classe des benzimidazoles, l'excrétion biliaire est favorisée chez le mébendazole, le fenbendazole, et l'oxfendazole, tandis qu'une excrétion urinaire prédominante est retrouvée pour le thiabendazole, le cambendazole, le parabendazole, l'oxfendazole, et l'albendazole (Hennessy, 1985 ; *in* Lacey, 1988).

\* (5) Les benzimidazoles sont des molécules hydrophobes et insolubles dans l'eau ce qui entraîne une possibilité d'altération de la biodisponibilité, de la pharmacodynamie et de l'efficacité par la galénique du produit.

### A-3-2) Pharmacologie *in vitro* des benzimidazoles :

Les techniques *in vitro*, mises au point pour la détection de la résistance aux antihelminthiques demandent l'acceptation de trois principes :

- l'hôte ne joue aucun rôle dans l'activité intrinsèque de la drogue.
- le site d'action est un composant vital sur la viabilité du cycle de vie des stades parasitaires utilisés dans les techniques *in vitro*.
- la dynamique des drogues disponible est comparable aux situations *in vivo*.

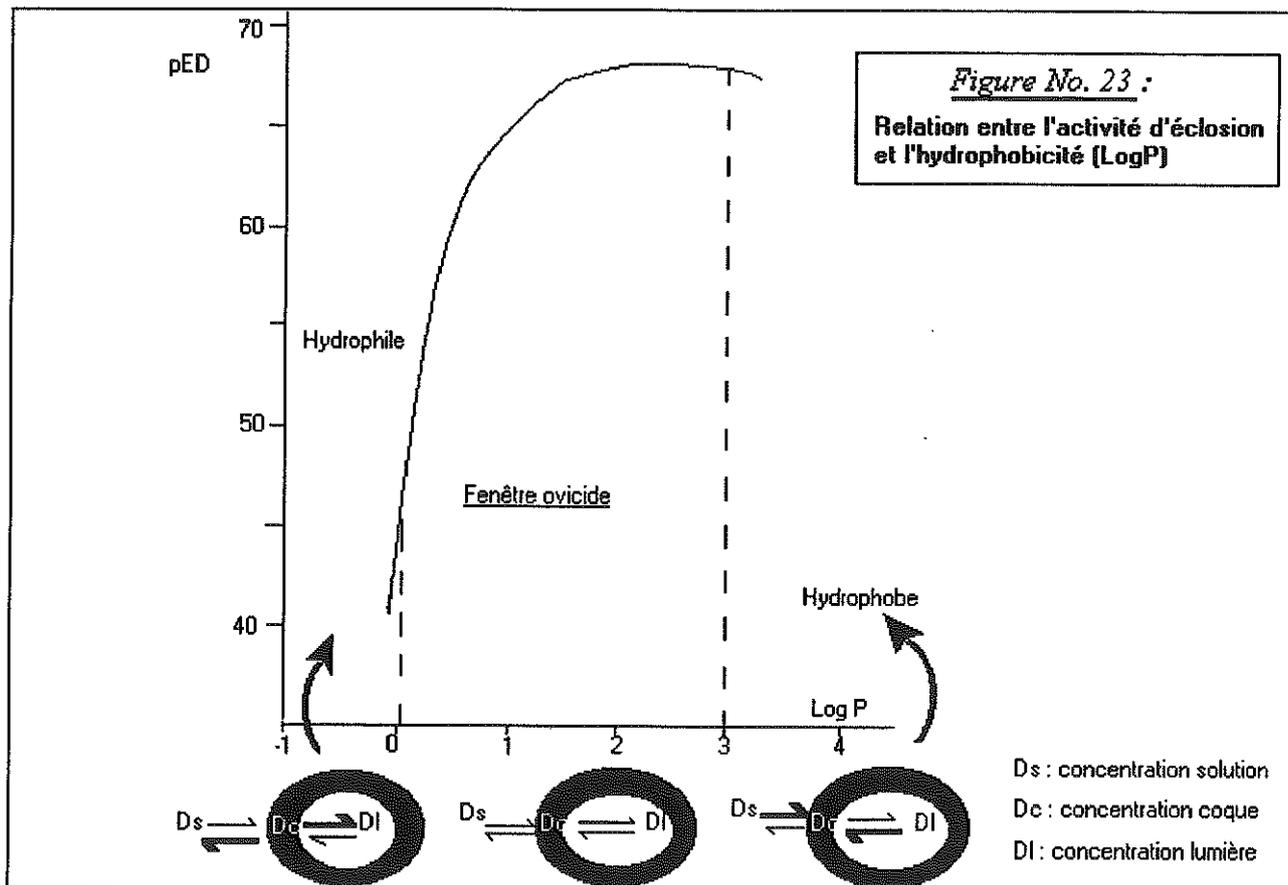
L'action des benzimidazoles reste très variée, comme l'inhibition du développement *in vitro*, la mobilité, et la survie des transitions entre les stades larvaires L<sub>2</sub> et L<sub>3</sub> (Rew *et al.*, 1986 ; *in* Lacey, 1988), L<sub>3</sub> et L<sub>4</sub> (Rew *et al.*, 1986 ; *in* Lacey, 1988), et L<sub>4</sub> et jeunes adultes (Jenkins, 1982 ; *in* Lacey, 1988), chez de nombreuses espèces de parasites.

La technique la plus largement utilisée pour déterminer l'activité des benzimidazoles est le test ovicide d'éclosion des oeufs. Les oeufs de Nématodes parasites isolés des féces sont incubés 24 à 48 heures en présence de benzimidazoles ; après ce délai, les proportions des larves et oeufs ou larves plus oeufs embryonnés et non-embryonnés sont calculées pour en déduire la valeur de l'ED<sub>50</sub> (dose requise pour réduire l'éclosion des oeufs de 50%). Cette technique fut initialement décrite en 1969 par Egerton (*in* Lacey, 1988) dans une étude comparative de l'activité ovicide du thiabendazole sur plusieurs espèces de parasites. Plus récemment, les données tirées de ces tests d'inhibition de l'éclosion des oeufs purent être corrélées avec une résistance *in vivo* aux benzimidazoles de *H. contortus* (Le Jambre, 1976 ; *in* Lacey, 1988), *T. colubriformis* (Coles *et al.*, 1977 ; *in* Lacey, 1988), *O. circumcincta* (Martin *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988), *N. spathiger* (Obendorf *et al.*, 1986 ; *in* Lacey, 1988). Lacey *et al.*, en 1987, montrent une corrélation entre l'inhibition de l'éclosion d'oeufs d'*H. contortus* et l'inhibition de la polymérisation de la tubuline de cellules cérébrales de mammifères, par les benzimidazoles. Pour les benzimidazoles commerciaux, comme le parabendazole, l'oxfendazole, l'albendazole, le mébendazole, le flubendazole, le fenbendazole et l'oxfendazole, ainsi que les métabolites majeurs, comme le mébendazole, le fenbendazole, l'oxfendazole et l'albendazole, les inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline sont aussi de puissants inhibiteurs de l'éclosion des oeufs, alors que les non-inhibiteurs échouent à empêcher l'éclosion. Le mode d'action primitif des benzimidazoles sur le développement des

oeufs semble donc se localiser sur l'inhibition d'un processus microtubule dépendant. Des études plus récentes, en examinant les différents degrés d'hydrophobicité des benzimidazoles, confirment cette corrélation en démontrant cependant que l'activité ovicide peut seulement être atteinte sur une étroite fenêtre de valeurs en  $\log P$  de 1 à 3,4. Les composés avec des valeurs en-dessous ou au-dessus de cette fenêtre ne possèdent pas d'activité ovicide mais peuvent montrer une activité larvicide (sur le développement de  $L_1$  à  $L_3$ ). La représentation graphique des cologarithmes des valeurs de l' $ED_{50}$  ( $pED_{50}$ ) en fonction du degré d'hydrophobicité trace une courbe parabolique où la pente positive montre une augmentation de l'activité en fonction de la solubilité lipidique et prouve que la sommation des propriétés hydrophobes est nécessaire pour l'absorption de la drogue. L'inhibition de l'éclosion est liée non seulement au mécanisme d'action, mais aussi à la capacité de passage à travers la coque jusqu'à la lumière de l'oeuf. Pour les dérivés hydrophiles ( $\log P$  faible), des concentrations élevées de drogues sont nécessaires pour atteindre une concentration efficace sur le site d'action. Pour les composés hautement hydrophobes ( $\log P$  fort) le passage dans la coque est réalisé mais l'équilibre final dans la lumière de l'oeuf n'est pas favorisé en raison de la relative hydrophobicité à proximité de la coque et de la lumière (figure No. 23). Ces données augmentent près de la zone négative du graphique, puisqu'une quantité de drogue plus importante est nécessaire pour saturer la coque, et donc atteindre la concentration interne efficace pour inhiber le développement de l'oeuf. Ces limitations pharmacologiques sont dépendantes de la nature de la coque et sont supprimées pour les larves en développement, où les inhibiteurs peuvent être utilisés en dehors de la fenêtre ovicide pour calculer la valeur de la  $DL_{50}$ . Des corrélations évidentes existent entre la  $DL_{50}$  et la capacité des benzimidazoles d'inhiber la liaison du mébendazole tritié à la tubuline parasitaire (*in lacey*, 1988). Généralement les benzimidazoles sont des inhibiteurs du développement larvaires (de  $L_1$  à  $L_3$ ) 10 à 20 fois plus puissants que sur l'éclosion des oeufs.

La toxicité dose-dépendante des benzimidazoles sur les stades en non-développement de Nématodes n'est pas entièrement prouvée. Les données disponibles montrent la non-létalité *in vitro* de l'adulte de *N. braziliensis* (Coles *et al.*, 1977 ; *in Lacey*, 1988), *F. hepatica*, (Rew *et al.*, 1986 ; *in Lacey*, 1988), et *A. suum* (Köhler et Bachmann, 1981 ; *in Lacey*, 1988). Des études sur les adultes et des larves  $L_3$  d'*H. contortus* et *T. colubriformis*, ne montrent pas une toxicité *in vitro* après une incubation en présence de benzimidazoles. L'incapacité de démonstration de la toxicité sur les stades ne se développant pas, *in vitro*, n'implique pas

une absence d'activité, puisqu'il est possible de détecter des perturbations dans la mobilité du parasite, dans l'absorption des nutriments, dans la sécrétion enzymatique ou dans l'activité enzymatique glycolytique. Il est évident que la toxicité manifeste semble associée exclusivement avec un phénomène de développement impliquant que la perturbation de certains mécanismes biochimiques dans le parasite n'est pas létale pour les stades en non-développement.



### A-3-3) Pharmacologie biochimique des benzimidazoles :

Les premières études du mode d'action des benzimidazoles se concentrèrent sur le rôle du métabolisme des hydrates de carbone. Dans des études comparatives de souches d'*H. contortus* résistantes (R) et sensibles (S) aux benzimidazoles, une inhibition différente de la fumarate réductase, enzyme anaérobie, par le thiabendazole, fut observée (Prichard, 1973). L'inhibition de la fumarate réductase par d'autres benzimidazoles (Cyclobendazole, fenbendazole, oxfendazole et mébendazole) avec des isolats sensibles et résistants confirmèrent cette hypothèse (Malkin et Camacho, 1972 ; Rahman *et al.*, 1977 ; in Lacey, 1988). La théorie de la fumarate réductase répondait aux critères de sélectivité des benzimidazoles : une cible sélective chez des parasites anaérobies avec une sensibilité réduite dans les isolats benzimidazoles résistants. Cependant cette enzyme ne réussissait pas à expliquer certaines observations comme, la perte de la relation structure-activité compatible avec l'efficacité *in vivo* à des concentrations thérapeutiques, l'inhibition par d'autres antihelminthiques de familles différentes (disophénol et lévamisole), (Prichard, 1973), une faible activité de contrôle (non-inhibée) chez les souches résistantes en comparaison avec les souches sensibles.

Les benzimidazoles montrèrent ensuite une activité inhibitrice sur le transport du glucose à la fois *in vitro* et *in vivo* dans de nombreuses espèces d'helminthes comme *A. suum*, *T. spiralis*, *S. mansoni*, *M. expansa* et *H. diminuta* et toujours associée avec une déplétion compensatrice des réserves en glycogène. Cependant, la capture du glucose n'était pas inhibée chez d'autres espèces comme *F. hépatica*, *T. colubriformis*, *N. dubius* et *H. contortus* (Behm et Bryant, 1985 ; in Lacey, 1988). L'investigation du transport du glucose chez *H. contortus* montre un mécanisme à deux composants, où un composant actif est prédominant à basse concentration de glucose, ce dernier étant sensible aux benzimidazoles, tandis qu'à forte concentration de glucose un mécanisme passif et insensible aux benzimidazoles apparaît. Par conséquent, il est probable que l'échec pour observer l'activité inhibitrice semble dû à la fois à l'absence d'un composant actif ou à une saturation dans les sites de capture du glucose, dont le transport passif représente le mécanisme de transport principal (Lacey, 1988). Comme la fumarate réductase, le transport du glucose montre une activité différente sur les souches sensibles ou résistantes aux benzimidazoles (mais à des concentrations < 10 µg, compatibles avec les concentrations efficaces *in vivo*). Cette

hypothèse, d'un site primaire sensible par ce mécanisme, fut encore considérée comme douteuse, en comparaison aux inhibiteurs de la capture du glucose connus comme : l'amoscanate, la diamfénétide, la dithiazinine, le niridazole ...

D'autres effets sur le métabolisme énergétique furent trouvés comme le découplage de la phosphorylation oxydative (Van den Bossche, 1972 ; *in* Lacey, 1988), une baisse des concentrations en ATP (Rahman *et al.*, 1977 ; *in* Lacey, 1988), et une altération de certaines voies métaboliques (Rahman *et al.*, 1977 ; Rew *et al.*, 1982 ; Sangster et Prichard, 1985 ; *in* Lacey, 1988). D'autres activités inhibitrices sur la décharge transmembranaire de protons, sur la synthèse et le catabolisme de la sérotonine, sur l'activité de la mono-amine oxydase liée aux membranes, et sur l'apport en sodium, ont été décrites (Lacey, 1988). De plus de fortes concentrations en glutathion-S-transférase sont décrites sur des souches d'*H. contortus* résistantes (Kawalek *et al.*, 1984 ; *in* Lacey, 1988).

Les benzimidazoles ont aussi montré une activité inhibitrice sur la sécrétion *in vitro* de l'acétylcholinestérase chez *N. brasiliensis*, résultant en une accumulation de cette enzyme dans le parasite (Watts *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988). Des études sur *T. colubriformis* confirment cette hypothèse en montrant une activité différente entre les souches résistantes et sensibles (Sangster *et al.*, 1985). La comparaison de cette action avec l'inhibition de la libération du neurotransmetteur induite par la colchicine, conduit à l'implication d'un mécanisme microtubulaire (Watts *et al.*, 1982 ; *in* Lacey, 1988). L'inhibition *in vivo* de la libération de l'acétylcholinestérase, composant essentiel du mécanisme de conservation du parasite dans son habitat, est suffisante pour expliquer l'expulsion de ce dernier.

Le concept de l'expulsion du parasite sans action létale fut pour la première fois décrite par Rahman *et al.*, en 1977 (*in* Lacey, 1988). Après une administration *in vivo* de mébendazole à des moutons infectés par *H. contortus*, *M. expensa* et *F. hepatica*, les parasites sont retrouvés viables jusqu'à 24 heures après le traitement, en dépit d'importants changements dans les concentrations des nucléotides totaux et du glucose (concentrations des autres métabolites inchangées). Les benzimidazoles induiraient donc de nombreux changements biochimiques, mais seulement certains d'entre eux seraient associés à un effet létal immédiat. Ceci prouve que l'expulsion du parasite de son site de prédilection semble due à l'incapacité de ce dernier à maintenir l'homéostasie et non à l'action biocide de la molécule.

Borgers et De Nollin, en 1975 montrèrent l'implication des benzimidazoles

(particulièrement du mébendazole) dans l'induction du catabolisme des microtubules des cellules intestinales d'*A. suum*. La caractérisation des benzimidazoles en tant qu'inhibiteurs de la liaison de la colchicine tritiée à la tubuline embryonnaire d'*A. suum*, permet de trouver une constante d'inhibition de 250 à 400 fois plus importante pour respectivement le mébendazole et le fenbendazole, en comparaison avec la tubuline de mammifère, montrant par là même la première indication de sélectivité (Friedman et Platzer, 1980 ; *in* Lacey, 1988). Cependant une seconde étude sur la liaison directe du mébendazole tritié sur la tubuline intestinale partiellement purifiée d'*A. suum* ne permit pas de confirmer cette hypothèse et la conclusion proposée fut que la sélectivité variable était due à la cinétique de la molécule dans l'hôte et la parasite (Köhler *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988).

Dawson *et al.*, en 1984 (*in* Lacey, 1988), comparent la capacité des benzimidazoles et de la colchicine à inhiber la polymérisation DMSO-induite de la tubuline d'*A. galli*. Pour le fenbendazole, le parabendazole, le mébendazole, et la colchicine, les valeurs de l' $I_{50}$  pour l'inhibition de la polymérisation de la tubuline d'*A. galli*, se situent entre 4 et 6  $\mu\text{M}$ , similaires à celle de la tubuline de mammifère au cours d'études parallèles (3,5 à 9  $\mu\text{M}$ ). L'oxfendazole et le thiabendazole sont significativement plus sélectifs pour la tubuline d'*A. galli*, que pour la tubuline de mammifère (respectivement 33 et 120 fois plus). A première vue, la sélectivité d'action contre les parasites est seulement démontrée pour deux analogues, et non pour les autres benzimidazoles et la colchicine. Cependant, si seulement une petite proportion de dimères de tubuline a besoin de se lier à la drogue pour inhiber la polymérisation, tout changement dans la sélectivité de la liaison peut être détecté par ces drogues incapables de se lier efficacement à la tubuline de mammifère (comme l'oxfendazole et le thiabendazole). Pour les autres ligands, la liaison (détectée soit par inhibition de la polymérisation, soit par déplacement de la colchicine tritiée) à la tubuline de mammifère est facilement démontrée ; par conséquent une interaction sélective ne peut pas être démontrée. Les essais de polymérisation, bien qu'étant une technique indirecte extrêmement sensible pour détecter la liaison du ligand, ne permettent pas de distinguer la solidité de la liaison en dehors des extrêmes où une quantité suffisante ou insuffisante de ligand est liée pour inhiber la polymérisation. Par exemple, la vinblastine, les podophyllotoxines et le mébendazole sont de plus puissants inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline de mammifère, que la colchicine. Pourtant, la colchicine seule forme un complexe solide pseudo-irréversible avec la tubuline. En résumé, la sélectivité de l'action des benzimidazoles peut seulement être

détectée dans les tests de polymérisation, pour les dérivés inactifs ou faiblement inhibiteurs de la tubuline de mammifère, et les composés inhibiteurs ne peuvent être explorés.

Une autre étude a étudié l'interaction benzimidazoles-tubuline parasitaire par comparaison avec la liaison de parabendazole tritié, d'oxybendazole tritié, et de colchicine tritiée, dans des épreuves de déplacement en utilisant des souches sensibles et résistantes de *T. colubriformis* (Sangster *et al.*, 1985). Pour les deux benzimidazoles, une constante d'association significativement basse ( $K_a$ ) et une quantité de liaison maximale ( $B_{max}$ ) des benzimidazoles tritiés sont observés pour les souches résistantes.

Les benzimidazoles sont connus pour inhiber une large variété de mécanismes apparemment non liés. Parmi ces mécanismes, la fumarate réductase, l'apport en glucose, et l'inhibition microtubulaire, satisfont chacun aux critères utilisables pour la détection d'un possible site d'action. Mais il est aujourd'hui évident que la fumarate réductase et l'apport en glucose ne sont pas spécifiques des benzimidazoles et sont maintenant considérés comme des sites sensibles pour l'accession à l'homéostasie du parasite et par là sont donc sensibles à divers effets associés à une agression chimique ou environnementale. Les différents comportements des souches sensibles et résistantes observés à la fois pour le fumarate et le glucose, semblent être secondaires, puisque la sélection aux benzimidazoles augmente la viabilité du parasite en présence du composé. Les différences dans les enzymes métaboliques sensibles semblent refléter que l'étendue de l'agression chimique est moins importante pour les souches résistantes en comparaison avec les souches sensibles.

Des sites de liaison à la tubuline ont été identifiés sur les membranes mitochondriales et plasmiques suggérant l'existence d'une interaction mitochondrie-tubuline, membrane plasmique-tubuline, possibles fonctions de régulation (Bernier-Valentin *et al.*, 1982, 1983 ; *in* Lacey, 1988). Divers enzymes solubles comme la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, l'aldolase, la pyruvate kinase et la lactate deshydrogénase peuvent se lier à la tubuline (Durrieu *et al.*, 1987 ; Karkhoff-Schweizer et Knull, 1987 ; *in* Lacey, 1988).

Des études plus récentes avec des inhibiteurs de la tubuline comme la colchicine et la podophyllotoxine, ainsi que des non-inhibiteurs comme la colchicine, la béta-lumicolchicine, et l'isocolchicine, démontrèrent que la colchicine et la podophyllotoxine inhibent à la fois la fumarate réductase et l'apport en glucose (Lacey, 1988).

#### A-3-4) L'interaction benzimidazole-tubuline dans les résistances des

### helminthe et les spécificités d'espèces :

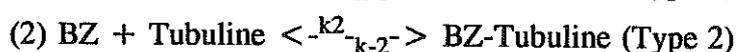
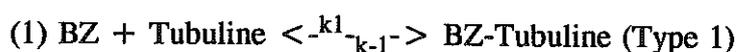
Le concept de la spécificité des benzimidazoles pour la tubuline parasitaire, déduit à la fois d'études de liaison de composés tritiés et de polymérisation supporte l'hypothèse que la sélectivité des benzimidazoles s'exerce au niveau du complexe tubuline-benzimidazole. L'observation de la liaison du [ $^{14}\text{C}$ ] carbénazime à la tubuline fongique, stable sur charbon, représente une singularité précédemment décrite pour l'interaction avec la colchicine tritiée uniquement. L'examen de l'extraction sur charbon de dérivés tritiés de mébendazole, parabendazole, oxybendazole, albendazole, fenbendazole et oxfendazole liés à la tubuline de souches résistantes ou sensibles d'*H. contortus*, montre que cette propriété est aussi caractéristique du complexe tubuline-benzimidazole (Lacey et Prichard, 1986). En général, l'affinité de la tubuline parasitaire pour la colchicine est 10 à 50 fois plus basse que celle observée sur la tubuline de mammifère. Le carbénazime tritié possède un faible niveau de liaison stables sur les extraits parasitaires, tandis qu'aucune liaison n'est détectée pour le thiabendazole tritié par la technique d'extraction sur charbon. Une purification partielle de la tubuline d'*H. contortus* une chromatographie avec polylysine montre que plus de 85 % des liaisons du mébendazole tritié stables sur charbon sont localisées dans la fraction tubulaire. Dans cette étude, la liaison du benzimidazole tritié n'est pas seulement dépendante de l'état de résistance de l'isolat mais aussi de la structure du benzimidazole. La résistance aux benzimidazoles a été aussi détectée par cette technique sur d'autres parasites comme *O. circumcincta*, *T. colubriformis* et *N. spathiger* (Lacey, 1988). Analogue au complexe colchicine-tubuline, la liaison benzimidazole-tubuline parasitaire stable sur charbon apparaît comme une interaction étroite, pseudo-irréversible, dans laquelle le marqueur n'est pas facilement dissocié par l'addition ultérieure d'un excès de ligand non marqué. Le complexe est, cependant, non covalent puisqu'une dissociation quantitative apparaît par la dénaturation de la tubuline par ébullition ou par extraction sur solvant (Lacey, 1988). La simplicité de la méthode et la robustesse de la liaison firent de l'extraction sur charbon, une des bases de la première technique de routine pour la détection biochimique des résistances des Nématodés parasites. La résistance peut être détectée sur tous les stades de développement, cependant cette technique est standardisée pour les larves L<sub>3</sub>. La liaison de mébendazole tritié à 10 grammes de surnageant brut, est quantitative, après 30 minutes d'incubation à 37°C suivie de 5 minutes d'extraction sur charbon et centrifugation. Pour *H. contortus*, *O. circumcincta*,

et *T. colubriformis*, tous les sites de liaison du mébendazole tritié sont saturés à des concentrations supérieures à  $0,3 \mu\text{M}$ , sans observer de différences cinétiques significatives entre les espèces. Sur les 24 isolats étudiés, l'importance de la liaison du mébendazole tritié est en corrélation avec l'état de résistance *in vivo* ou *in vitro*, connu. La corrélation de l'état de résistance, avec un changement dans le site de liaison sensible à l'extraction sur charbon, indique que cette technique est capable de déterminer la toxicité sélective des benzimidazoles comme antihelminthiques. En comparant la liaison du mébendazole tritié et l'efficacité *in vivo* sur une sélection d'helminthes, une corrélation est observée pour les Nématodes gastro-intestinaux.

La durée d'exposition est un composant important de l'action des benzimidazoles pour tout parasite dans lequel le mécanisme d'expulsion de l'hôte prend un temps significativement plus long que la demi-vie pharmacologique de la drogue *in vivo*. Empiriquement cette limitation est levée en augmentant l'action de la drogue par de fortes doses et un traitement prolongé ou répété. Même si d'autres aspects de la pharmacodynamie des benzimidazoles, comme le métabolisme, l'absorption, la pharmacocinétique et l'excrétion, modulent l'action de ces derniers, la spécificité du complexe benzimidazole-tubuline et la dynamique de l'hôte pour l'expulsion du parasite restent les paramètres les plus importants pour l'efficacité *in vivo*.

Bien que la spécificité soit caractérisée par les liaisons stables sur charbon, il est important de considérer comment l'efficacité est atteinte sur les espèces où de faible quantité de liaisons stables sur charbon avec les benzimidazoles tritiés sont observées. Dans le cas extrême de la tubuline de mammifère, les benzimidazoles inhibent à la fois la polymérisation et la liaison de la colchicine tritiée et sont aussi capables de former un complexe réversible avec la tubuline. *In vitro*, la toxicité des benzimidazoles est démontrée sous des conditions statiques où la drogue est en contact continu avec les cellules (Styles *et al.*, 1974 ; in Lacey, 1988), mais pas en conditions dynamiques *in vivo*. Ces résultats impliquent l'existence d'un équilibre biologique réversible entre le pool de drogue extra et intra-cellulaire, ce dernier étant lui même en équilibre réversible et rapide avec la tubuline. Lorsque les concentrations de drogues décroissent par des processus de métabolisme ou d'excrétion, la dissociation du complexe apparaît, réduisant l'étendue de l'inhibition par les benzimidazoles. Il est plausible que la liaison des benzimidazoles soit composée au minimum de deux composants, une liaison stable sur charbon et une fraction réversible non stable sur charbon. L'utilisation *in*

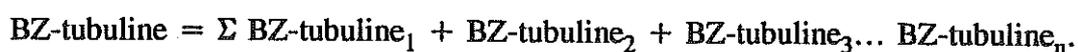
*vivo* de doses divisées ou d'administration prolongée, est un compromis entre les conditions dynamiques de l'élimination de la drogue par l'hôte et les conditions statiques de disponibilité de la drogue, vues dans de nombreuses techniques *in vitro*, où les oeufs et les larves sont constamment exposés à des concentrations de drogues suffisantes pour entretenir une inhibition microtubulaire par des mécanismes réversibles. La présence de liaisons additionnelles réversibles du mébendazole tritié sur les liaisons stables sur charbon pré-citées a été caractérisée pour *F. hepatica* par filtration sur gel (Lacey, 1988). Le rôle de la durée d'exposition dans, d'une part la dynamique de l'élimination du parasite et, d'autre part l'efficacité contre les espèces insensibles ou résistantes peut être résumé par un équilibre :



- Le type 1 représenterait le complexe réversible, se dissociant au taux ( $k_{-1}$ ) où la concentration des benzimidazoles tombe par l'excrétion *in vivo*.

- Le type 2 se caractérise au contraire par la liaison stable sur charbon, pseudo-irréversible, où la dissociation apparaît au bout d'un temps beaucoup plus long ( $k_2 \ll k_{-1}$ ).

Dans les conditions *in vivo* les liaisons de type 1 existent seulement lorsqu'une concentration suffisante de benzimidazoles est maintenue, tandis que les liaisons de type 2 décroissent à un taux indépendant de la pharmacodynamie de l'hôte. Pour les deux complexes, l'efficacité est dépendante du fait que  $k_2$  (ou  $k_{-1}$ ) est plus important que le taux d'expulsion parasitaire. Il semble que la variation inter-espèces de ces liaisons stables sur charbon soit due à la microhétérogénéité de la tubuline. En effet, il est probable que les pools de tubuline soient composés de multiples isotypes avec des variations structurales conférant une stabilité variable au complexes BZ-isotubuline. Une telle hypothèse implique que pour chaque espèce et pour chaque individu, l'ensemble des interaction BZ-tubuline est un composite des affinités des isotubulines :



où chaque complexe possède une affinité différente qui est dépendante, soit d'un changement au site de liaison, soit d'un effet allostérique issu d'une variation altérant la conformation du site de liaison.

Dans la classe des benzimidazoles, le thiabendazole, le cambendazole montrent une efficacité *in vivo*, similaire aux nouveaux carbamates de benzimidazoles. Bien que ces derniers montrent de subtiles différences dans leur activité, tout ces composés sont de

puissants inhibiteurs à des concentrations inférieures à celles observées *in vivo*. Pour les molécules inhibitrices non liées structuralement, un intéressant modèle de leur activité est observé. La colchicine est approximativement 600 fois moins active pour les bas eukaryotes et le seul dérivé colchicinoïde possédant une activité est l'analogue des cycles A et C, le MTPT. L'isomère spécifique des microtubules, le tubulozole C et son analogue inactif le tubulozole T, sont inactifs, comme plusieurs autres analogues, confirmant ainsi que la présence du domaine carbamate n'est pas indispensable à l'activité (Gupta, 1986 ; *in* Lacey, 1988). Les déazadihydroptéridines montrent une activité inhibitrice comparable aux benzimidazoles. Aucune activité ne fut démontrée pour les ligands du site de liaison de la vinblastine, ainsi que pour les autres classes de ligands du site de liaison de la colchicine. Parmi les autres inhibiteurs la podophyllotoxine, mais pas ses analogues, montre une activité modérée.

En 1990, Lubega *et al.*, se penchent sur l'interaction spécifique des benzimidazoles avec la tubuline chez *H. contortus*. Ces auteurs montrent que le nombre de liaisons est significativement réduit dans la souche résistante en comparaison avec la souche sensible. D'après ces résultats, les auteurs concluent que la résistance aux benzimidazoles serait due à une perte en sites de liaison de haute-affinité de la tubuline chez la population résistante.

En 1992, Gill et Lacey, étudient la cinétique de la liaison du mébendazole à la tubuline d'*H. contortus*. La lente dissociation du mébendazole de la tubuline de Nématode, contraste avec la rapide dissociation de ce composé avec la tubuline de mammifère. La toxicité sélective des benzimidazoles résulte en une différence entre l'affinité des tubulines de mammifères et de Nématodes pour cette drogue. Russell et Lacey, en 1992, remarquent la différence de stabilité du complexe benzimidazole-tubuline dans des isolats sensibles et résistants aux benzimidazoles d'*H. contortus*, et *T. colubriformis*. Un même niveau de liaison du mébendazole tritié est observé pour les isolats sensibles et résistants de chaque espèce. Mais il est suggéré que la réduction du nombre de liaisons pseudo-irréversibles des benzimidazoles chez les isolats résistants résulte en une augmentation dans le niveau de liaison réversibles et par conséquent, procure une augmentation de la survie des Nématodes résistants.

### A-3-5) La résistance aux benzimidazoles : mutants génétiques. modèles et parasites :

La résistance aux benzimidazoles fut décrite pour la première fois dans les années soixante suivant un traitement au thiabendazole (Drudge *et al.*, 1964 ; Conway, 1964). Depuis cette époque, la sélection d'une résistance aux benzimidazoles pose un problème étendu, bien que sporadique dans le contrôle des Nématodes gastro-intestinaux chez les animaux d'herbages.

Pour les Nématodes parasites, de nombreux efforts de compréhension de la nature de la transmission ont été faits par une approche génétique quantitative. Le Jambre *et al.*, en 1979 (*in* Lacey, 1988), en pratiquant des croisements entre isolat résistant et sensible d'*H. contortus* et un test d'éclosion des oeufs, conclurent que la résistance aux benzimidazoles dépendait d'un simple trait dominant au sein d'un fond polygénique. Des études d'efficacité *in vivo*, sur des croisements d'isolats résistants au cambendazole d'*H. contortus*, montrèrent, cependant, l'existence d'un gène récessif avec aussi une implication polygénique (Herlich *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988). Une autre étude sur *T. colubriformis*, trouve l'orientation du gène unique inacceptable (Martin, 1987 ; *in* Lacey, 1988). Ces études génétiques sur parasite peuvent être regardées à la lumière des expériences de liaison des benzimidazoles tritiés qui démontrent le rôle de la tubuline dans la résistance aux benzimidazoles. Une analyse individuelle des vers par une quantification de la liaison d'oxybendazole tritié sur des souches benzimidazole-résistantes et benzimidazole-sensibles d'*H. contortus*, démontre que, si la souche benzimidazole-résistante était composée d'une population unique, la souche benzimidazole-sensible restait hétérogène, renfermant une distribution bimodale avec six maxima ou inflexions locaux dans cette population (Lacey *et al.*, 1988). Les liaisons de la population sensible dépassent celle de la population résistante et prolongent d'un facteur dix la moyenne des liaisons des souches résistantes. Ces données suggèrent que les isolats sensibles ne sont pas homogènes et que lors d'un croisement sensible x résistant, l'émergence d'une polygénéité apparente est inévitable. L'existence d'une microhétérogénéité de la liaison des benzimidazoles tritiés, n'est pas inattendue puisque la liaison du mébendazole tritié sur plusieurs isolats benzimidazole-sensibles d'*H. contortus*, et aussi de *T. colubriformis* ont montré leur différence (Lacey et Snowdon, 1988). L'origine de la variation dans la liaison des benzimidazoles tritiés sur des individualités parasitaires dans une population non

benzimidazole-sélectionnée est encore inconnue, mais elle est compatible avec la microhétérogénéité de la tubuline chez les eukaryotes. L'existence de nombreux isotypes d' $\alpha$  et  $\beta$ -tubuline peut être calquée directement sur le génome de la tubuline et n'implique pas nécessairement de modifications post-traductionnelles (Lee *et al.*, 1986 ; *in* Lacey, 1988). A l'exception des champignons et de *Tetrahymena*, les gènes de l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline de toutes les espèces déjà examinées, sont de nature multigénique (Cleveland et Sullivan, 1985 ; *in* Lacey, 1988). En résumé la résistance aux benzimidazoles est certainement un phénomène polygénique lié au génome de la tubuline.

L'intérêt intense pour la fonction des microtubules dans les cellules eukaryotes date de la fin des années soixante-dix par le développement de mutants sur la tubuline dans plusieurs organismes modèles. La résistance aux benzimidazoles et autres ligands du site de la colchicine, sur ces modèles, résulte en des changements structuraux impliquant la tubuline et des protéines non tubulaires, ces dernières étant représentées par des protéines spécifiques à la matrice microtubulaire, mais aussi par des protéines indépendantes de tels mécanismes (Ling et Thompson, 1974 ; *in* Lacey, 1988). Des mutations apparaissent à la fois pour l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline, souvent associées avec des changements apparents dans le poids moléculaire et les points isoélectriques. Sur les mutants résistants aux benzimidazoles caractérisés, la majorité des mutations est localisée sur la  $\beta$ -tubuline avec peu de mutants sur l' $\alpha$ -tubuline décrits. Ces données ont conduit les auteurs à conclure que le site de liaison de la colchicine était localisé, soit sur la  $\beta$ -tubuline, soit sur l'interface  $\alpha$ - $\beta$  (Oakley et Morris, 1985 ; *in* Lacey, 1988). La dernière hypothèse est un compromis entre les données sur la mutation de la tubuline, les liaisons d'affinité et les études électrophorétiques qui penchent pour un site présent sur l' $\alpha$ -tubuline. Cependant, une explication alternative, pour la prépondérance de mutants sur la  $\beta$ -tubuline, que l'on ne peut, ne pas prendre en compte, semble indiquer que les mutations apparaissant sur l' $\alpha$ -tubuline, sont létales.

La liaison des ligands tritiés est corrélée avec une toxicité *in vitro* pour les mutants d'*Aspergillus nidulans*, *ben 13* et *ben 14* (résistant au bénomyl) (Davidse et Flach, 1977 ; *in* Lacey, 1988), ainsi que pour les cellules CHO mutantes sous colchémide (N-méthyl-desacétylcolchicine), (Keates *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988). Cependant une résistance phénotypique n'est pas toujours associée avec une altération de la liaison aux ligands tritiés (Cabral *et al.*, 1980 ; Gupta et Gupta, 1984 ; *in* Lacey, 1988). Pour de nombreux mutants l'émergence d'un profil aberrant de résistance reflète des changements dans plusieurs sites (colchicine, vinblastine et taxol), la sensibilité à la température, et une morphologie microtubulaire anormale suggérant que plusieurs mutations de résistance impliquent un changement dans la dynamique des microtubules. Ces phénomènes résultent de changements structuraux dans la tubuline qui altèrent les variations conformationnelles associées à la liaison avec le ligand et à la polymérisation. Dans de tels mutants, c'est le rôle fonctionnel du site agissant comme un mécanisme de contrôle inhibiteur, qui est outrepassé, et non la liaison du ligand en soi. L'apparition de changements conformationnels sur le site de liaison de la colchicine sur la tubuline chez les mutants prouve l'existence de mutants résistants et sensibles. L'observation d'une sensibilité différente entre les ligands du site de la colchicine sur quelques mutants fournit un outil indispensable dans la compréhension de la nature de l'interaction ligand-tubuline dans le site de la colchicine. Par exemple la liaison du carbénazime [<sup>14</sup>C] à la tubuline du mutant résistant au bénomyl *ben 13* et au mutant hypersensible *ben 14* chez *A. nidulans*, reflète la toxicité du bénomyl *in vitro* sur la croissance (Davidse et Flach, 1977 ; *in* Lacey, 1988). Pour les cellules CHO, la sélection des mutations avec le nocodazole et la podophyllotoxine met en évidence une interaction chimique étroite du nocodazole et de la podophyllotoxine avec la tubuline en comparaison avec la colchicine et indique une perte de la corrélation entre le thiabendazole et les autres benzimidazoles (Gupta, 1986 ; *in* Lacey, 1988).

La comparaison des résultats issus de ces modèles de Nématodes parasites suggère que seulement une petite proportion de mutants résistants sont compatibles avec le mécanisme de résistance aux benzimidazoles *in vivo* où la résistance est spécifiquement due à une réduction de la liaison des benzimidazoles tritiés.

Une étude plus récente de Roos, (*in* Köhler, 1990) en 1990 a été tentée pour définir les bases de génétique moléculaire de la résistance aux benzimidazoles. Ces auteurs ont investis le polymorphisme de l'ADN dans le génome de souches résistantes et sensibles de

L<sub>3</sub> et d'adultes d'*H. contortus* en utilisant comme sonde, des séquences d'ADN de tubuline clonée à partir de la même espèce parasitaire (restriction fragment length polymorphism ou RFLP). Une analyse du Southern blot démontre que le fragment de restriction homologue à la  $\beta$ -tubuline est hautement polymorphe dans les souches sensibles aux benzimidazoles. Dans cette population vermineuse, un maximum de six fragments différents est visualisé en utilisant à la fois des sondes d'ADN d' $\alpha$  et de  $\beta$ -tubuline. Cependant dans les populations non-affectées par les benzimidazoles seulement un ou deux fragments peuvent être identifiés avec une sonde de  $\beta$ -tubuline, tandis qu'une sonde de séquence d' $\alpha$ -tubuline ne montre aucune différence entre souches sensibles et résistantes. Il existe une grande hétérogénéité entre les individus de la population sensible, comme le démontre le grand nombre de sonde de  $\beta$ -tubuline réagissant avec les fragments d'ADN. Au contraire, plusieurs individus de la population résistante ne possèdent seulement qu'un fragment d'ADN visible par la RFLP d'approximativement 9 kb. L'observation que ce dernier fragment est aussi présent chez certains hétérozygotes de la population sensible, suggère que ces individus, qui sont homozygotes pour un fragment de 9 kb réagissant avec la sonde de  $\beta$ -tubuline, ont été sélectionnés par un traitement. Ces études montrent que ce fragment, caractéristique des populations résistantes aux benzimidazoles, de 9 kb, est préexistant chez de nombreux individus sensibles et, par conséquent, non-généré par une mutation suivant un traitement. Les études de liaison de ligands et les études de l'ADN confirment, toutes les deux, l'existence chez les Helminthes de plusieurs isotypes d' $\alpha$  et de  $\beta$ -tubuline codés par des famille de gènes de la tubuline. Des études sur les autres systèmes eukaryotes montrent que les différents isotypes possèdent chacun un rôle particulier. Cette diversité fonctionnelle de plusieurs formes de tubuline semble être à l'origine de l'hétérogénéité observée dans les capacité de liaison des benzimidazoles entre différents individus, populations et espèces. L'analyse comparée de l'ADN génomique d'*Haemonchus* sensible et résistant indique que les population résistantes possèdent une variation, peut-être un complément réduit des gènes de la  $\beta$ -tubuline en comparaison aux populations sensibles. La structure du gène de la  $\beta$ -tubuline conférant la résistance aux benzimidazoles pourrait baisser l'expression des isotypes de la  $\beta$ -tubuline sensibles aux benzimidazoles ou exprimer une perte de site de haute-affinité de la  $\beta$ -tubuline liant les benzimidazoles, rendant ainsi la drogue inefficace (Roos, 1990 ; *in* Köhler, 1990). Des études, par Enos et Coles, en 1990 (*in* Köhler, 1990), montrent que des souches de *C. elegans* résistantes à l'albendazole possèdent une altération de la structure de la  $\beta$ -tubuline.

D'autres études sur ce même Nématode prouvent que le grand nombre de mutations conférant la résistance aux benzimidazoles seraient dues à un seul gène de  $\beta$ -tubuline (Driscoll *et al.*, 1989 ; in Köhler, 1990). La résistance dans cet organisme est développée en éliminant le gène *ben-1* codant pour le seul isotype de  $\beta$ -tubuline significativement sensible aux benzimidazoles. La fonction de ce gène est probablement redondante dans le génome du Nématode, mais son absence entraîne une résistance. La résistance résulterait d'une perte d'un isotype de  $\beta$ -tubuline ou d'une mutation ponctuelle dans les gènes de  $\beta$ -tubuline, comme cela a été décrit dans les systèmes fongiques (May *et al.*, 1985 ; Stearns et Botsein, 1988 ; in Köhler, 1990). Un gène de  $\beta$ -tubuline apparaissant associé à la sensibilité aux benzimidazoles de *T. colubriformis* a été utilisé pour transformer *C. elegans* en une souche transgénique supportant le gène parasite sur un aïre extrachromosomale (Grant, 1992). Le transgène de la tubuline parasite posséderait un effet sur la susceptibilité de *C. elegans* aux benzimidazoles et le degré de dominance de la résistance est significativement réduit dans un croisement de souches résistantes et sensibles, portant, toutes deux le transgène (Grant, 1992).

### A-3-6) Nature de l'interaction des inhibiteurs de la formation des microtubules sur le site de la colchicine :

La pharmacologie des benzimidazoles, d'un point de vue biochimique *in vivo* et *in vitro*, est compatible avec un site d'action primaire sur la tubuline. Il est donc intéressant de se focaliser sur la nature de la liaison sur le site non seulement pour les benzimidazoles mais aussi pour les autres composés occupant ce site. Plusieurs modèles pour l'interaction spécifique des analogues de la colchicine, avec des degrés variables de complexité, sont compatibles avec un modèle global.

#### \* Hypothèse générale pour le site de liaison:

Les ligands types du site de la colchicine portent deux similarités chimiques identifiables :

- 1 - un groupement sensible à une substitution nucléophile
- 2 - de fortes restrictions structurales permettant de distinguer la puissance de l'activité dans chaque classe.

Pour la colchicine et ses analogues actifs, le site nucléophile est le système méthoxytropone. Il faut considérer ce système comme analogue chimiquement à un ester de vinyl (Cook et Loudon, 1951 ; *in* Lacey, 1988). Le déplacement nucléophile par l'eau (hydrolyse), par les amines et par les groupements thiol est maintenant bien documenté (Zweig *et al.*, 1973 ; Shiau *et al.*, 1976 ; *in* Lacey, 1988). Pour les carbamates de benzimidazoles et les autres carbamates, le déplacement du groupe méthoxy (hydrolyse et transcarbamylation) sur les carbamates s'effectue dans les mêmes conditions (*in* Lacey, 1988). Une trans-estérification, une hydrolyse et un déplacement des lactones (podophyllotoxine) ou des esters (allo-colchicine) sont aussi des réactions chimiques nucléophiles fondamentales. Des sites nucléophiles sont aussi présents dans les cétones  $\alpha$ - $\beta$ -insaturées comme la griséofulvine, ainsi que sur des réactifs plus évidents comme les agents alkylants et acylants qui interagissent avec les sites de la colchicine.

Cette caractéristique chimique commune implique une réactivité avec des groupements nucléophiles comme -SH, -NH<sub>2</sub>, et -OH. L'observation qu'une dérivation sélective de la cystéine (mais pas de la lysine) inhibe la liaison aux sites de la colchicine, implique que la

cystéine joue un rôle dans la liaison comme partie de la complexation. Une participation de la sérine a été proposée, cependant sa faible nucléophilie la rend inefficace pour tout autres composés que les lactones et les esters (Lacey, 1988).

Pour la colchicine, la podophyllotoxine et les carbamates de benzimidazoles, le schéma proposé pour la substitution nucléophile, semble impliquer la formation d'un complexe tétraédrique (pyramide à base triangulaire)  $\sigma$  qui tend vers une liaison covalente par élimination d'un alcool (figure No. 24). Puisque la covalence n'est pas observée pour ces ligands, il est raisonnable de supposer que dans le site, l'attaque nucléophile soit maintenue dans un complexe  $\sigma$ . Pour la colchicine et les autres tropolones le complexe  $\sigma$  est stabilisé en résonance par la délocalisation d'un électron. Dans les structures de résonance possible, la forme énolate ( $-\text{CH}^--\text{CH}_2=\text{O} \rightleftharpoons -\text{CH}=\text{CH}-\text{O}^-$ ) assure une contribution dominante à la densité en électrons puisque l'atome (l'oxygène) le plus électronégatif ( $\delta^-$ ) porte la charge négative. Par conséquent, le groupement cétone en 9 possède moins le caractère de double liaison. Ceci implique une extension intéressante à l'hypothèse de départ proposée par Detrich *et al.*, en 1981 (*in* Lacey, 1988) ; en effet dans la liaison de la colchicine à la tubuline, le noyau tropolone "plissé" supporte un changement conformationnel qui conduit non seulement à une conformation plus plane, mais aussi à une conformation avec seulement un caractère carbonyle partiel. Une autre observation, approuve l'hypothèse du complexe  $\sigma$ , c'est l'augmentation de la fluorescence de la colchicine après liaison. Bhattacharyya et Wolff, en 1984 (*in* Lacey, 1988), proposent la liaison de ce phénomène à l'immobilisation de la colchicine dans le site, cependant une seconde interprétation réside dans le fait que la fluorescence est due à un allongement de la conjugaison causé par la délocalisation des électrons. Pour examiner cette possibilité, le spectre de fluorescence de la colchicine en présence d'hydroxydes et de thiols est comparé à celui de la colchicine base. Dans tous les cas, l'augmentation de la fluorescence (de 20 à 100 fois) apparaît. Ceci montre que l'existence d'une tropolone ionisée, comme le postule cette hypothèse, augmente la fluorescence.

Puisque la formation d'un complexe  $\sigma$  est le dernier stade stabilisé de la liaison nucléophile, des formes intermédiaires, où une polarisation  $\delta^+ \dots \delta^-$  existe, entre les groupements du ligand et de la cystéine tubulaire peuvent se développer. Pour plusieurs ligands moins actifs (par exemple le thiabendazole), ces formes intermédiaires représentent l'étendue maximale de la réaction nucléophile, alors que pour d'autres ligands, où aucune

polarisation n'existe, la liaison dépend de l'absence d'interactions stériques de thiols, entre eux non favorables, et des interactions acceptables avec les acides aminés adjacents. Cependant, l'existence d'un caractère  $\delta^-$  au site nucléophile peut être incompatible avec l'activité aussi observée pour la colchicine, le 2-aminobenzimidazole et l'acide podophyllique.

La forme générale de ce domaine de liaison est relativement plane comme le reflète l'observation que tous les ligands capables, soit de former un complexe  $\sigma$ , soit d'atteindre une stabilité partielle, sont eux-mêmes plans ou capables d'adopter une conformation relativement plane de basse énergie. Par contre les non-inhibiteurs comme la picropodophylline sont incapables d'adopter de telles conformations (Zavala *et al.*, 1980 ; *in* Lacey, 1988).

Dans les modèles existants de sites de la colchicine, l'hypothèse d'un modèle bifonctionnel à cycle A-C a été établie. Le cycle A triméthoxyphényl (TMP) est considéré comme un domaine commun pour la colchicine, la podophyllotoxine et la stéganacine. Pour atteindre une orientation similaire dans le site nucléophile, la podophyllotoxine et la colchicine exigent le groupement méthylènedioxybenzène pour occuper le site TMP-colchicine. Cette observation est compatible avec les descriptions structurales des benzylbenzodioxoles, où le groupement 4-méthoxyphényl seul, suffit à l'activité et dans lesquels, ils constituent un équivalent de la podophyllotoxine pour le ligand TMP de cette série (Batra *et al.*, 1985 ; *in* Lacey, 1988). L'apparition d'une liaison d'un phényl 3,4-disubstitué avec le site du cycle A est aussi la seconde substitution favorable dans les séries m-MTPB. Ce domaine de liaison pour le cycle méthylènedioxy semble placer le cycle TMP de la podophyllotoxiné et des stéganacines dans une région correspondant au substituant du cycle B pour la colchicine : B'. L'explication, que la liaison du cycle A soit due à une hydrophobicité optimale ou à un effet de taille, reste inconnue. Pour la région A-C, une longueur optimale entre le centre nucléophile de la colchicine, ses analogues, et le groupement 4-méthoxy du cycle TMP est approximativement de 9 à 10 Å.

La liaison de la région B' est structurellement non-spécifique en comparaison avec le cycle A, avec une activité de nouveau dépendante de la lipophilie ou de la taille du substituant (Quinn et Beisler, 1981 ; *in* lacey, 1988). La superposition de la structure des carbamates de benzimidazole et des dihydroptéridines sur la colchicine avec l'interaction avec la tubuline par un unique attachement au site nucléophile ne peut pas loger le substituant en

5 des benzimidazoles et le substituant en 3 des déazadihydroptéridines dans la limitation structurale du modèle A-C. Puisque les benzimidazoles non-substitués et les carbamates de déazadihydroptéridine sont eux-mêmes plus grands que 10 Å, la taille optimale de ces dérivés et de nombreux autres carbamates aromatiques, doit résulter dans la liaison de substituants sur une région A étendue : A', qui existe, soit au-dessus, soit au-dessous du plan A-C.

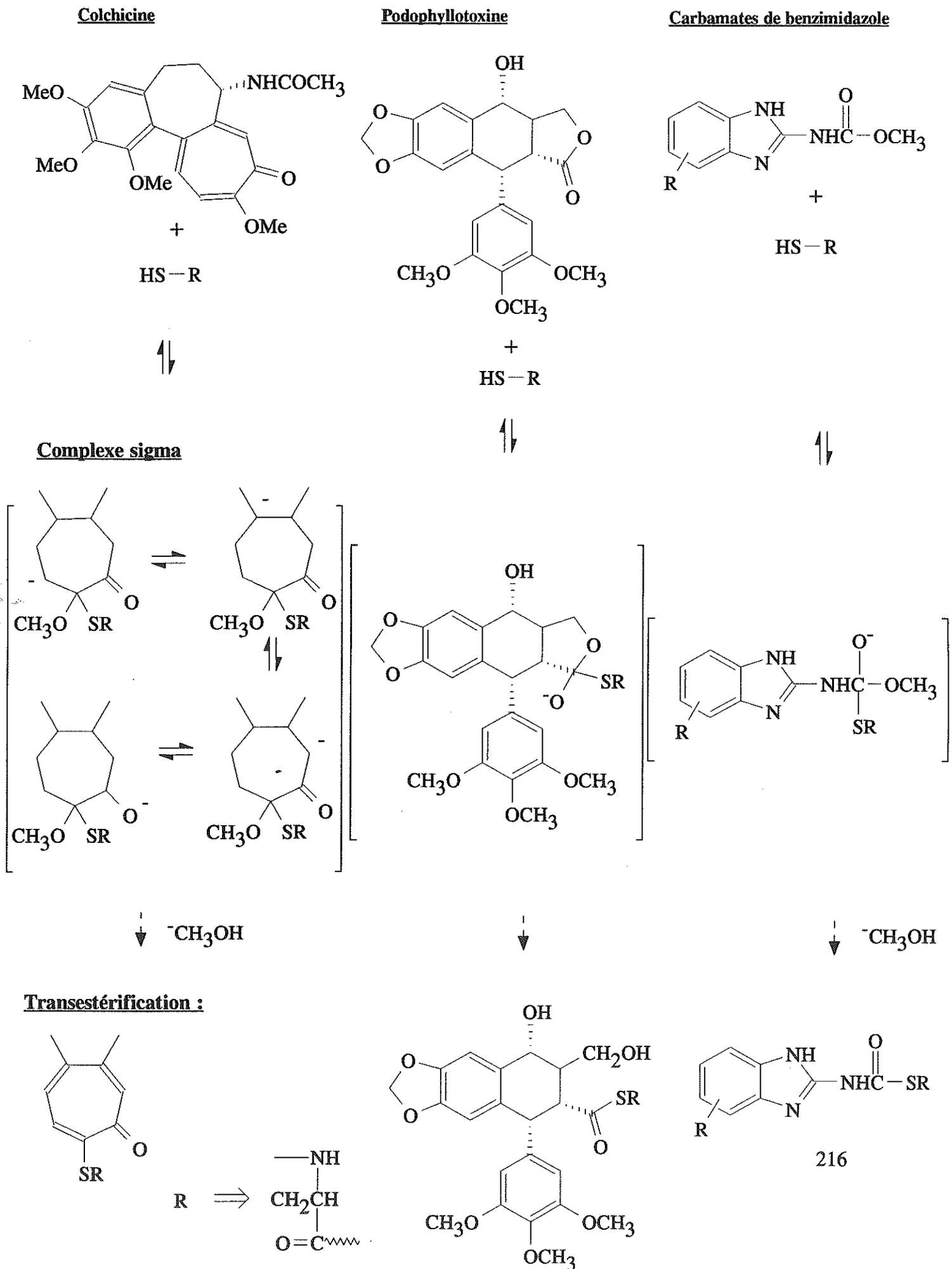
La large taille du cycle B des analogues substitués de la colchicine, et leur diversité structurale est compatible avec la structure des benzimidazoles substitués en 5 et des déazadihydroptéridines et suggère que les régions A' et B' sont relativement non spécifiques sur le plan structural dans la restriction géométrique imposée par la liaison de la région A-C.

Pour cette hypothèse générale du site de liaison, le cycle B est fondu dans le domaine plan A-C, compatible avec le maintien de l'activité inhibitrice par l'introduction d'une insaturation dans le cycle B (Rösner *et al.*, 1981 ; *in* Lacey, 1988). En utilisant cette hypothèse, les ligands du site de la colchicine peuvent être divisés en quatre classes majeures, AC (MTPT, MTBT, MBC, thiabendazole, et griséofulvine), AA'C (carbamates de benzimidazole substitués, déazadihydroptéridines substitués, tubulazole et autres carbamates aromatiques), AB'C (colchicine, podophyllotoxine, et stéganacine) et AB' (benzylbenzodioxoles substitués et combretastatine). Pour la tubuline de mammifère, l'activité extrêmement large d'analogues prétendus "site unique", comme la méthyltropolone et les triméthoxybenzènes, suggère qu'une occupation d'au moins deux domaines de liaison est exigée pour une activité puissante. Il est probable que la liaison au site de la colchicine exige un accès simultané à toutes les régions par de puissantes interactions hydrophobes ou électrostatiques. Cette complexation est menée par la relative répulsion des ligands de l'environnement hydrophile, mais restreinte par l'exigence absolue d'une géométrie compatible entre le cycle AC et le site AC. Une incompatibilité semble conduire à une préférence soit sur AB', soit sur B'C, soit à une dissociation du complexe. Des optimisations conformationnelles ultérieures impliquent la formation d'une interaction  $\delta^+ \dots \delta^-$  entre le ligand C et les acides aminés polaires disponibles. Lorsque cette interaction  $\delta^+ \dots \delta^-$  est due à une cystéine et que les conditions géométriques et énergétiques sont favorables, le complexe  $\sigma$  se forme. La conversion d'un carbone  $sp^2$  (géométrie trigone plan, hybridation trigonale) en un  $sp^3$  (géométrie tétraédrique, hybridation tétraogonale), induit un changement conformationnel majeur dans le ligand. Une interaction plus tardive, probablement par une liaison hydrogène sur la protéine, est nécessaire pour stabiliser le caractère  $\delta^-$  créé soit sur

l'oxygène du carbonyle du carbamate ou de la podophyllotoxine, soit sur le groupement cétonique en 9 de la tropolone. L'éloignement de la cystéine de l'oxygène  $\delta^-$ , expliquerait l'intervention d'un second acide aminé polaire, comme le tryptophane, l'arginine, l'histidine, la sérine ou la lysine, ces derniers devant être adjacents à la cystéine pour stabiliser l'augmentation de l'électronégativité en jouant le rôle de donneur de liaison hydrogène. La cinétique de la liaison pseudo-irréversible de la colchicine diffère de celles de tous les autres analogues de la colchicine ne possédant pas un groupement amide en position 7 (démécoline, désacétamido colchicine et MTPT) et d'autres inhibiteurs structurellement non-liés qui montrent une cinétique réversible. Puisque l'interaction de la bromo-colchicine avec la tubuline, suivie par un traitement acide, conduit à la formation d'un acide cystéinylacétique ( $\text{CH}_2\text{COOH}$  est dérivé du groupement  $\text{BrCH}_2\text{CONH-}$  du substituant en 7 par alkylation et hydrolyse), une stabilisation  $\delta^+ \dots \delta^-$  plus tardive entre la cystéine et l'acétamide de carbonyle peut arriver dans le domaine B' de la colchicine. Cette interaction représente un équilibre relativement lent conduisant à la pseudo-irréversibilité de la colchicine et à l'exigence d'une enthalpie fortement positive pour la colchicine en comparaison aux autres tropolones, entraînant une dépendance à la température caractéristique de l'interaction libre colchicine-tubuline. En général, il apparaît que la sensibilité aux colchinoïdes est un développement relativement récent dans l'évolution de site à la colchicine avec une haute affinité pour la liaison de la colchicine tritiée, restreint aux hauts eukaryotes (Hains *et al.*, 1978 ; *in* Lacey, 1988). La majorité des bas eukaryotes comme les levures, les champignons sont relativement insensibles à la colchicine (à des concentrations supérieures aux mM) avec une liaison de la colchicine tritiée faible ou non détectable. Pour les helminthes la liaison de la colchicine tritiée peut être détectée mais par des études de déplacement du mébendazole tritié, la colchicine est alors deux à trois fois moins active, tandis que les autres colchinoïdes sont complètement inactifs. La podophyllotoxine a été moins intensément étudiée, cependant, en comparant les données sur les mammifères à celle des helminthes, son activité est réduite mais pas dans les mêmes proportions que pour la colchicine. Cela implique des changements dans les domaines A et B'. Les benzimidazoles sont des inhibiteurs puissants de toutes les tubulines eukaryotes étudiées jusque là. Cependant, dans cette large spécificité, la spécificité optimale due à un changement dans l'interaction benzimidazole-tubuline apparaît chez les bas eukaryotes. La comparaison de l'activité relative des benzimidazoles envers la tubulines des helminthes et des mammifères implique le perfectionnement structural du domaine A',

puisque des composés comme l'oxfendazole, le rycobendazole et d'autres benzimidazoles plus polaires sont significativement moins actifs contre la tubuline des mammifères, mais que sa large spécificité structurale reste inchangée. Lors des études de déplacement du mébendazole tritié, il est apparu des changements structuraux dans tous les domaines de liaison. L'étendue de ces changements semble plus important dans la région B' puisque à la fois les ligands AB'C et AB' sont largement dénués d'activité.

**Figure No. 24 - Mécanismes de l'attaque nucléophile par un résidu cystéinyl de la colchicine, de la podophyllotoxine, des carbamates de benzimidazole. (D'après Lacey, 1988).**



\* Emplacement du site de la colchicine :

La localisation du site à la colchicine sur la tubuline  $\alpha$  est inspirée de nombreuses études d'alkylations et de photoactivations avec des analogues substitués sur le cycle B (Williams *et al.*, 1985 ; *in* Lacey, 1988). La liaison est située à, respectivement, 2 et 12 Å pour le cycle B lui-même. Ces observations sur l'association de la tubuline  $\alpha$  suggèrent que le domaine de liaison B' est entièrement localisé sur la tubuline  $\alpha$  et que cette région est proche d'un résidu cystéinyl. Une étude de la liaison de la colchicine à la tubuline avant et après trypsinolyse a localisé le site de la colchicine dans un fragment de poids moléculaire de 5000 de la tubuline  $\alpha$  (Serrano *et al.*, 1984 ; *in* lacey, 1988). En utilisant un modèle de clivage par la trypsine, il est possible de localiser une séquence entre les résidus Arg 339 et Arg 373 (Sackett et Wolff, 1986 ; *in* lacey, 1988). Jusqu'à présent les études de déplacement des liaisons avec des analogues sont insuffisantes pour caractériser si la liaison est due à un site de liaison A-, B'-, ou C, soit unique, soit multiple. Pourtant une cystéine est localisée à côté d'un donneur de liaisons hydrogène potentiel, le tryptophane en 346, avec une séquence de 8 acides aminés hautement conservée dans cette région de poids moléculaire de 5000. L'implication du tryptophane comme donneur de liaisons hydrogène est compatible avec les études de fluorescence de la tubuline. Pour certains auteurs, ce tryptophane est localisé à proximité de l'interface  $\alpha$ - $\beta$  (Prasad *et al.*, 1986 ; *in* lacey, 1988).

L'observation que les ligands du site de la colchicine inhibent la formation du croisement (cross-link) de la  $\beta^*$ -tubuline entre les résidus cystéinyl 239 et 354, qui sont séparés, dans la structure tertiaire, de seulement 9 Å, montre l'implication de la  $\beta$ -tubuline (Little et Luduena, 1985, *in* Lacey, 1988). Cette distance est compatible avec un arrangement des cystéines, soit de AC, soit de AA'. La construction d'un modèle de site à la colchicine basé sur les données disponibles révèle un site avec trois ou quatre résidus cystéinyl dans une étroite proximité. Un résidu cystéinyl de la  $\beta$ -tubuline, probablement le 239, est associé avec le domaine du cycle A, tandis que le résidu 354 se trouve, soit dans le domaine B', 9 Å plus loin, soit dans le site nucléophile dans le domaine C, une cystéine d' $\alpha$ -tubuline encore non identifiée occupant le domaine B'. Alternativement, une quatrième cystéine du résidu 347 sur la tubuline  $\alpha$  lie le cycle C en un complexe  $\sigma$ . L'interaction du domaine C avec, soit la cystéine 354 de la bêta-tubuline, soit la cystéine 347 de la tubuline  $\alpha$ , est basée sur leur conservation dans les espèces sensibles aux carbamates de benzimidazole où la position 239

de la  $\beta$ -tubuline est la sérine (Little *et al.*, 1985 ; *in* Lacey, 1988). Le réarrangement des cystéinyl de la tubuline  $\alpha$  est basé sur la probabilité que le complexe  $\sigma$  soit le domaine le plus stable et le moins sensible à la destruction par trypsinolyse. Chacune des cystéines identifiées est incluse dans une séquence relativement bien conservée non associée avec les autres sites de liaison reconnus. L'hypothèse d'un site riche en groupement cystéinyl est compatible avec des études de marquage des thiols qui suggèrent que l'inhibition de 50% de la liaison de la colchicine tritiée exige l'alkylation d'au moins trois résidus cystéinyl (Ikeda et Steiner, 1978 ; *in* Lacey, 1988).

\* Fonction du site de la colchicine :

Contrairement aux connaissances sur le rôle des MAP's et sur les autres protéines dans le contrôle de l'équilibre tubuline-microtubule, le rôle du site de la colchicine dans les régulations endogènes a reçu une grande attention par une série de travaux effectués par Lockwood en 1978 et 1979, identifiant l'existence de plusieurs protéines et peptides inhibant la liaison de la colchicine tritiée. D'autres études ont décrit l'isolement d'autres protéines solubles et possédant une action similaire (Sherline *et al.*, 1979 ; *in* Lacey, 1988).

Une hypothèse alternative du concept du ligand endogène est que les ligands du site de la colchicine sont intercalés dans un domaine de régulation essentiel. L'état de ce dernier serait normalement contrôlé par des interactions allostériques. Dans cette hypothèse, le domaine de liaison formerait un équilibre entre une conformation active et inactive, peut être atteinte par la variation de l'arrangement spatial de la clef d'acides aminés comme la cystéine dans ce domaine.

Par une modulation allostérique, soit d'autres protéines, soit du GTP, soit d'autres mécanismes, cet équilibre peut être orienté vers des changements conformationnels qui maintiennent le site dans un état actif ou inactif pour son auto-assemblage. Les ligands du site de la colchicine semblent agir par liaison sur l'état actif du site, inhibant les étapes ultérieures exigées pour la polymérisation. Le concept du site de la colchicine équivalent à un domaine de régulation comme opposé à un ligand endogène, peut expliquer sa conservation dans l'évolution et justifie aussi le parallèle existant entre la liaison de la colchicine tritiée et l'état de l'auto-assemblage issu d'une destruction température-dépendante, des effets des modifications chimiques, de la stabilité en fonction du pH et de la force

ionique. Cette hypothèse permettrait une explication plus satisfaisante de la diversité des mutants résistants à la colchicine, puisque ces mutants ne seraient alors pas obligés de changer la structure de leur site de la colchicine, mais seulement les fonctions de régulation du site comme le suggèrent les mutants à microtubules hyperstabilisés (Oakley, 1981 ; *in* Lacey, 1988).

## B) CONCLUSION :

L'équilibre tubuline-microtubule est essentiel pour tous les eukaryotes. L'état de cet équilibre est contrôlé par l'interaction de co-facteurs activateurs (GTP,  $Mg^{2+}$ ) et inhibiteurs ( $Ca^{2+}$ ), ainsi que plusieurs séries de protéines associées. Le centre de la régulation endogène est un nombre de domaines structuraux, où la conformation est extensivement remaniée pendant l'assemblage de la tubuline. Bien que la structure intime des domaines de liaison soit encore connue partiellement, la diversité structurale des inhibiteurs interagissant avec ces sites et l'activité pharmacologique résultante, sont compatibles avec le rôle essentiel de ces domaines dans la tubuline. La relation entre la liaison de l'inhibiteur et l'activité biochimique *in vivo* et *in vitro*, est plus visible sur les cellules en développement où l'utilisation de la tubuline dans le fuseau mitotique est dramatiquement affectée avec des conséquences létales. Dans les cellules en non-développement, la relation entre la liaison et une action physiologique est moins évidente par le fait que des changements biochimiques sont observés mais qu'ils ne sont pas associés à la létalité dans la même échelle de temps. Les actions diverses des inhibiteurs peuvent dans de nombreux cas être directement corrélées à la liaison avec la tubuline mais dans certaines situations, cette relation est obscurcie par des interactions indirectes comme l'inhibition d'une hormone, l'activité d'une enzyme ou d'un neurotransmetteur.

Les interactions du ligand avec le domaine structural du site de la colchicine, font l'objet d'une hypothèse générale expliquant l'hétérogénéité des ligands. Cette hypothèse, basée sur la structure tricyclique de la colchicine, définit un site commun chargé d'une réactivité nucléophile par un résidu cystéinyl pour le cycle C, avec des régions à large spécificité structurale A' et B', et enfin une région plus structurellement spécifique, A. Par essence, les ligands les plus actifs sur le site de la colchicine peuvent être considérés comme des réactifs géométriquement contraints par une alkylation légère. Les géométries des

inhibiteurs exigées pour une interaction avec une liaison soit AC, soit AA'B, soit AB'C, soit AB' sont différentes bien que non mutuellement exclusives. D'après la littérature, il est probable que ce site contienne au moins trois cystéines dérivées à la fois de la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ .

Dans les parasites, l'action pharmacologique des benzimidazoles est compatible avec un mode d'action primitif lié à l'équilibre tubuline-microtubules. En comparant les données connues sur les mammifères et les parasites, il apparaît que la capacité de liaison à la tubuline est l'objet d'une grande variété de sélectivité dans la classe (par exemple l'oxfendazole et le rycobendazole), ceci suggérant un élargissement de la relation structure-activité pour l'interaction dans le domaine liant le substituant en 5, et semble indiquer des changements structuraux dans la région A' de la tubuline de ces espèces. Cependant, c'est la nature de la cinétique de la liaison et l'existence d'un équilibre pseudo-irréversible chez les helminthes qui sont responsables de la sélectivité d'espèces observées pour les benzimidazoles dans une classe. Le facteur le plus important responsable de l'étendue de la modulation de la liaison avec la tubuline et de l'efficacité est lié aux mécanismes de l'expulsion parasitaire. Bien que l'action des benzimidazoles soit non létale pour les stades en non développement comme les adultes et les larves en survie, l'efficacité est dépendante de la relation entre la cinétique de l'interaction benzimidazole-parasite et de l'expulsion parasitaire. Quand le déroulement de l'expulsion est lent en comparaison avec la liaison tubuline-benzimidazole, l'efficacité est faible et irrégulière malgré l'observation biochimique et parasitologique que les benzimidazoles exercent un effet. Il y a deux aspects à ce problème :

- 1 - pour les helminthes avec un haut degré de liaison stable sur charbon (*D. immitis* et *O. gibsoni*), il est nécessaire de changer la biodisponibilité de la drogue telle que la cinétique de la liaison et de l'expulsion se déroulent dans le même temps.

- 2 - pour les parasites avec un faible degré de liaisons stables sur charbon, il est alors nécessaire de concevoir à nouveau des benzimidazoles avec un fort degré de liaison pseudo-irréversible. Cette approche est à l'étude pour développer des benzimidazoles avec une activité contre les isolats résistants aux benzimidazoles.

#### 5-2-4-2 - LE PRAZIQUANTEL :

Le praziquantel {2-cyclohexylcarbonyl[1,2,3,6,7,11*b*]hexahydro-4H-pyrazino[2,1-*a*]isoquinolin-4-one} appartient à la famille des pyrazinoisoquinoléines. Il a été découvert en 1975 par Thomas *et al.* (*in* Andrews et Thomas, 1983). Il est utilisé dans le traitement des bilharzioses et des autres trématodoses comme les distomatoses à douves du foie et pulmonaires, chez l'homme où la spécialité se dénomme Biltricide<sup>®</sup> (*in* Andrews et Thomas, 1983) ; ainsi que pour le traitement des trématodoses et cestodoses vétérinaires (Droncit<sup>®</sup>). Son mode d'action, bien qu'incomplètement élucidé, est particulier et lui vaut sa place dans le chapitre traitant des composés affectant l'intégrité cellulaire. Les Trématodes et les Cestodes exposés au praziquantel montrent une contraction tétanique instantanée de la musculature parasitaire et une vacuolisation rapide du tégument syncitial, rendant le parasite sensible aux attaques immunologiques de l'hôte (*in* Andrews et Thomas, 1983). Ces deux phénomènes seraient sous la dépendance du calcium, en augmentant la perméabilité membranaire de cet ion et aboutissant à une accumulation de calcium intra-cellulaire. Des effets plus tardifs sont également décrits comme une dépolarisation du tégument du Schistosome, une inhibition de l'apport en glucose, une chute des réserves en glycogène chez *H. diminuta* et *S. mansoni*, une stimulation de la libération de lactate chez *H. diminuta* (*in* Andrews *et al.*, 1983). Les résistances sur les Nématodes ne sont pas développées du fait de l'utilisation de cet antihelminthique sur les cestodoses et trématodoses.

## CONCLUSION

La résistance des Nématodes intestinaux aux antihelminthiques et principalement aux benzimidazoles est un phénomène cosmopolite dont les conséquences économiques sont inégales selon les pays.

*L'hémisphère Sud* semble le plus atteint. Les trois pays les plus intéressés par la résistance des strongles gastro-intestinaux sont :

- 1 - l'Afrique du Sud (fréquence importante des souches multirésistantes et apparition précoce de souches résistantes à l'ivermectine)

- 2 - l'Australie (sur *Haemonchus sp*, *Trichostrongylus sp*, *Teladorsagia sp*, avec 90% des élevages ovins présentant des résistances aux benzimidazoles et 80% au lévamisole au cours des années 80)

- 3 - la Nouvelle-Zélande (sur *H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Cooperia sp*, *Oesophagostomum sp* et depuis 1983 sur *N. spathiger*, ce dernier étant très pathogène pour les jeunes agneaux de par la plus grande résistance dans le milieu extérieur des stades larvaires, le développement larvaire se faisant à l'intérieur de la coque de l'oeuf).

L'apparition de ces résistances s'expliquent dans ces régions par :

1) des climats chauds et humides et parfois tempérés (sud de la Nouvelle-Zélande)

2) un élevage extensif favorisant un parasitisme gastro-intestinal constant et entraînant la nécessité de traitements réguliers.

*Le continent Américain* en totalité est touché (genre le plus concerné : *Haemonchus*). Les élevages d'Amérique du Sud se trouvent dans une situation proche de ceux de la Nouvelle-Zélande, l'Australie ou l'Afrique du Sud. Le pays le plus exposé est le Brésil, développant lui aussi une nouvelle résistance à l'ivermectine en plus de celle aux benzimidazoles, déjà plus ancienne.

*Le continent Européen*, enfin, possède des résistances, mais de moindre importance que dans l'hémisphère sud. Ces résistances sont décrites pour la Belgique, le Danemark, l'ex-République fédérale d'Allemagne, la Suisse, la Hollande, la France, le Royaume-uni (en général, pour les pays à forte pluviosité). Les espèces concernées sont *H. contortus*, *T. colubriformis* et *T. circumcincta*, ainsi que *Cooperia sp* et *Nematodirus sp*. Le Royaume-Uni est principalement concerné de par son élevage ovin très développé et ses rapports commerciaux avec ses partenaires du Commonwealth, lui permettant l'importation d'animaux vivants porteurs de souches résistantes. En France les données sont récentes (Gevrey et Robin, 1984, in Beugnet, 1991) avec la première souche de *Cooperia sp* résistante découverte en 1984. Des résistances ont surtout été étudiées pour les élevages ovins dans le Val de Loire (résistance de souches d'*H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis* aux benzimidazoles), (INRA Tours-Nouzilly), par Kerboeuf *et al.* depuis 1985 ; en Limousin (sur des souches d'*H. contortus*, *T. colubriformis*, *T. circumcincta*, *T. trifurcata*, *C. curticei* aux benzimidazoles) et des études sont réalisées dans la région Rhône-Alpes sur la résistance aux benzimidazoles (Beugnet, 1991). Dans les DOM-TOM Français et spécialement en Martinique les résistances de souches d'*H. contortus* de petits ruminants aux benzimidazoles sont importantes (Bastien *et al.*, 1989). Le problème des résistances est donc un phénomène mondial, se généralisant à toutes les classes d'antihelminthiques tels :

- 1 - les benzimidazoles, où la résistance reste très développée de par la large utilisation de ces composés, la fréquence de leur emploi et le large spectre de ces molécules. Nous avons vu que le mécanisme intime de la résistance impliquait l'inhibition de la polymérisation de la tubuline par une variation génétique entre les souches sensibles et résistantes. L'inhibition du système fumarate réductase, de l'apport en glucose et l'inhibition de la sécrétion d'acétylcholinestérase ne seraient que les conséquences de l'action tubulaire des benzimidazoles.

- 2 - les imidazothiazoles et les tétrahydropyrimidines agissant comme agonistes cholinergiques et dont la résistance pourrait être due à une variation du nombre ou de la

sensibilité du site de liaison de ces molécules entre souches sensibles et résistantes.

- 3 - la pipérazine, ses dérivés et les avermectines agissant sur les sites GABA-sensibles et ayant une action GABA-mimétique. La résistance aux avermectines nouvellement apparues est actuellement sous investigation.

- 4 - les salicylanilides, découplant la phosphorylation oxydative, surtout employés comme fasciolicides et dont de nombreuses résistances de Nématodes sont décrites.

L'apparition de ces résistances sur pratiquement tous les composés antihelminthiques connus, a entraîné la poursuite de nombreuses voies de recherche dont:

-1 - la synthèse de nouvelles molécules aux propriétés antihelminthiques comme les trifluorométhanesulfonamides, agents découplant la phosphorylation oxydative par leur capacité de conduire les protons à travers la membrane mitochondriale (grâce à leur lipophilie) et donc d'agir comme un protonophore lipophile abaissant la production d'ATP mitochondrial par déséquilibre du gradient électrochimique transmembranaire (Mc Cracken *et al.*, 1993).

Les synthèses des mylbémicycines B-41D par une souche mutante de *S. avermitilis*, de l'oxime de milbémicycine pour le contrôle des dirofilarioses et ancylostomoses, de la némadectine à large spectre et de combinaison galénique d'ivermectine et de pyrantel, sont des alternatives au développement de la résistance à l'ivermectine (Campbell, 1993).

Enfin les 3-(2-thiénylvinyloxy)indoles sont des dérivés où le groupement tétrahydropyrimidine est remplacé par un groupement indole. Un de ces dérivés le 1-phényloxy-2-chloro-3-(2-thiénylvinyloxy)indole montre une activité inhibitrice sur une enzyme cruciale du métabolisme de l'*Ascaris*, le complexe mitochondrial I ou NADH : ubiquinone oxydoréductase (Andreani *et al.*, 1992).

Il faut également parler des inhibiteurs de la cystéine protéase comme les monofluorométhylcétone et des inhibiteurs des transglutaminases, deux enzymes intervenant au cours de la mue du parasite qui représentent une nouvelle cible pour la chimiothérapie des Helminthes (surtout dans l'onchocercose), (Lustigman, 1993).

- 2 - le développement d'hôtes résistants ou de "vaccins" contre les Nématodes. Ainsi Gill *et al.*, en 1993 montrent que les cellules T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle crucial dans la

résistance génétique à *H. contortus* chez le mouton, dans la génération de l'hyperplasie des mast cells du mucus, de l'éosinophilie tissulaire, des anticorps anti-*Haemonchus*. En effet l'administration d'anticorps monoclonaux de souris anti-CD4<sup>+</sup> à des moutons génétiquement résistants, supprime complètement l'expression de leur résistance génétique. La différence de sensibilité à l'haemonchose entre génotypes de mouton peut être due aux variations de la fonction des cellules T-helper. Ces auteurs suggèrent que les vaccins efficaces doivent comprendre une protéine recombinante, ou un peptide synthétique, équivalents à un antigène parasite d'une taille capable de sensibiliser les cellules T CD4<sup>+</sup>, qui vont répondre en produisant les cytokines essentielles à la lutte naturelle contre le parasite.

Emery et Wagland, en 1991, font le point sur les vaccins contre les Nématodes gastro-intestinaux et remarquent que les succès les plus spectaculaires engendrent une protection supérieure à 90 % contre *H. contortus* en utilisant un complexe d'antigènes nommé H110D et H45D sur un élevage de moutons Anglais et une protection de 46 à 54 % contre le même parasite par la tropomyosine de L<sub>3</sub> sur des moutons Mérinos. D'autres protéines semblent donner une protection de 30 à 60 % et de 60 % sur, respectivement, *T. colubriformis* et *O. circumcincta* chez le mouton.

Ces perspectives de développements futurs sont à prendre en compte pour la maîtrise du problème que pose la résistance, reflet de l'adaptation de tout organisme aux multiples variations de son environnement.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- 1 - ABALIS I.M., ELDEFRAWI A.T.. (1986) [<sup>3</sup>H]Muscinol binding to a putative GABA receptor in honey bee brain and its interaction with avermectin B<sub>1a</sub>.  
*Pestic. Biochem. Physiol.* 25 279-287, in CAMPBELL, 1989.
- 2 - AGARWAL A., SHUKLA O.P., TEKWANI B.L.. (1992) Characterization of Ca<sup>2+</sup>-ATPase of *Setaria cervi* (Nematoda : Filarioidea): effect of phenothiazines and anthelmintics.  
*International Journal for Biochemistry* 24 (9) 1447-1452.
- 3 - AISA E. et al.. (1982) *Comparative Biochemistry and Physiology C* 71 119-122, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 4 - AKIYAMA T., TANAKA K., TANAKA N., NONOMURA Y.. (1978) Interaction of viomycin and aminoglycoside antibiotics with tubulin and microtubules.  
*Journal of Antibiotics* 31 1306-1309, in LACEY, 1988.
- 5 - ALBERT J., LINGLE D.H., MARDER E., O'NEIL M.B.. (1986) A GABA-activated chloride-conductance not blocked by picrotoxin on spiny lobster neuromuscular preparations.  
*British Journal of Pharmacology* 87 771-779, in CAMPBELL, 1989.
- 6 - ANDERSON N.. (1985) The controlled release of anthelmintics for helminth control in ruminants. In : ANDERSON N., WALLER P.J., *Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs*, 127-136, CSIRO Division of Animal Health and Australian Wool Corporation, Glebe, N.S.W., in MARTIN P.J., 1990.
- 7 - ANDERSON N., MARTIN P.J., JARRETT R.G.. (1988) Mixtures of anthelmintic : A strategy against resistance.  
*Australian Veterinary Journal* 65 62-64, in MARTIN, 1990
- 8 - ANDERSON N., MARTIN P.J., JARRETT R.G.. (1991) The efficacy of mixtures of albendazole sulphoxide and levamisole against sheep nematodes resistant to benzimidazole and levamisole.  
*Australian Veterinary Journal* 68 (4) 127-132.

9 - ANDREANI A., RAMBALDI M., LOCATELLI F., POGLAYEN G., DEGLI ESPOSTI M. (1992) 3-(2-thienylvinyl)indoles as potential specific inhibitors of the energy metabolism in helminthic parasites.

*European Journal for Medical Chemistry* 27 729-734.

10 - ANDREWS P., THOMAS H.. (1983) Praziquantel.

*Medicinal Research Reviews* 3 (2) 147-200.

11 - ANYA A.O.. (1966) Studies on the biology of some Oxyurid Nematodes. II. The hatching of eggs and development of *Aspiculuris tetraptera* Schultz, within the host.

*Journal of Helminthologie* 40 261-268, in MOULIA, 1992.

12 - ARENA J.P., LIU K.K., PARESS P.S., CULLY D.F.. (1991) Avermectin-sensitive chloride current induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus* oocytes.

*Molecular Pharmacology* 40 368-374, in ARENA *et al.*, 1992.

13 - ARENA J.P., LIU K.K., PARESS P.S., SCHAEFFER J.M., CULLY D.F.. (1992) Expression of glutamate-activated chloride current in *Xenopus* oocytes injected with *Caenorhabditis elegans* RNA : evidence for modulation by avermectin.

*Molecular Brain Research* 15 339-348.

14 - ARUNDEL J.H., BOERSEMA J.H., BRUYNING C.F.A., CROSS J.H., DAVIS A., DE MUYNCK A., JÄNSSEN P.G., KAMMERER W.S., MICHEL J.F., MIRCK M.H., RICKARD M.D., ROCHETTE F., SEWELL M.M.H., VAN DEN BOSSCHE H.. (1983) Chemotherapy of gastrointestinal helminths.

*Editeurs : Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo*, 719 p.

15 - Association Francaise des Professeurs de Parasitologie. (1990) Parasitologie, mycologie.

*Editions C. et R.*, 4<sup>e</sup> édition 1990, 412 p.

- 16 - ATCHINSON W.D., GEARY T.G., MANNING B., VAN DE WAA E.A., THOMPSON D.P.. (1992) Comparative neuromuscular blocking actions of levamisole and pyrantel-type anthelmintics on rat and gastrointestinal nematode somatic muscle.  
*Toxicology and Applied Pharmacology* **112** (1) 133-143.
- 17 - AUBRY M.L., COWEL P., DAVEY M.J., SHEVDE S.. (1970) Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic : pyrantel.  
*British Journal of Pharmacology* **38** 332-344, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 18 - AUSTIN W.C., COURTNEY W., DANILEWICZ J.C., MARGAN D.H., CONOVER L.H., HOWES H.L., LYNCH J.E., McFARLAND J.W., CORNWELL R.L., THEODORIDES V.J.. (1966) Pyrantel tartrate, a new anthelmintic effective against infections of domestic animals.  
*Nature* **212** 1273-1274, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 19 - BADGER S.B., McKENNA P.B.. (1990) *New Zealand Veterinary Journal* **38** 72-74, in SHOOP, 1993.
- 20 - BANE S., PUETT D., MacDONALD T.L., WILLIAMS R.C.. (1984) Binding to tubulin of the colchicine analogue 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)tropane.  
*Journal of Biological Chemistry* **259** 7391-7398, in LACEY, 1988.
- 21 - BARGER I.A.. (1988) Effects of controlled release albendazole capsule on parasitism and productivity of Merino ewes and lamb in a summer rainfall zone.  
*Australian Advances in veterinary Science* 1988 63-64, in MARTIN P.J., 1990.
- 22 - BARNES E.H., DOBSON R.J.. (1990) Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep : computer model to stimulate grazing systems and the evolution of anthelmintic resistance.  
*International Journal for Parasitology* **20** (7) 823-831.

- 23 - BARRETT J.. (1984) The anaerobic end-product of helminths.  
*Parasitology* 88 179-198, in SANGSTER et PRICHARD, 1985.
- 24 - BARTON N.J.. (1980) Emergence of *Haemonchus contortus* resistant to thiabendazole  
*Australian Veterinary Journal* 56 46-47, in ROLFE, 1990.
- 25 - BASTIEN O., KERBOEUF D., LEIMBACHER F., GEVREY J., NICOLAS J.A.,  
HUBERT J.. (1989) Mise en évidence de strongles résistants aux benzimidazoles dans les  
élevages ovins de la Martinique.  
*Recueil de Médecine Vétérinaire* 165 (5) 461-467.
- 26 - BATRA J.K., JURD L., HAMEL E.. (1985) Structure-function studies with derivatives  
of 6-benzyl-1,3-benzodioxole, a new class of synthetic compounds which inhibit tubulin  
polymerisation and mitosis.  
*Molecular Pharmacology* 27 94-102, in LACEY, 1988.
- 27 - BEAUMONT-SCHWARTZ C., KERBOEUF D., HUBERT J.. (1987) Methodes de  
mise en évidence de souches de strongles gastro-intestinaux résistantes aux anthelminthiques.  
*Recueil de Médecine Vétérinaire* 163 (6-7) 683-688
- 28 - BEHM C.A, BRYANT C.. (1979) Anthelmintic action. A methode approach.  
*Veterinary Parasitology* 5 39-49, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 29 - BEHM C.A., BRYANT C.. (1985) *The modes of actions of some modern anthelmintics  
in resistance in Nematodes to anthelmintic drugs.*  
In ANDERSEN N., WALKER P.J., Editeur : CSIRO, Australie ; Chapitre 5, p. 55-66, in  
BEUGNET, 1991.
- 30 - BEHNKE J.M.. (1974) The distribution of larval *Aspicularis tetraptera* Schultz during  
a primary infection in *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* and *Apodemus sylvaticus*.  
*Parasitology* 69 391-402, in MOULIA, 1992.

31 - BEKKAOUI A.. (1988) Essai de différenciation enzymologique de souches sensibles et résistantes aux anthelminthiques chez *Haemonchus contortus*.

Mémoire de DEA, Université François Rabelais, Tours, in BEUGNET, 1991.

32 - BENNETT E.M.. (1981) Biochemical studies on the nature of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*.

*Australian National University, Ph.D.Thesis*, 1981, in SANGSTER et PRICHARD, 1985.

33 - BENNETT E.M., BRYANT C.. (1984) Energy metabolism of adult *Haemonchus contortus* *in vitro* : a comparaison of benzimidazole-susceptible and -resistant strains.

*Molecular and Biochemical Parasitology* **10** 335-346.

34 - BERNIER-VALENTIN F., AUNIS D., ROUSSET B.. (1983) Evidence for tubulin-binding sites on cellular membranes : plasma membranes, mitochondrial membranes and secretory granule membranes.

*Journal of Cell Biology* **97** 209-216, in LACEY, 1988.

35 - BEUGNET F.. (1991) La résistance aux anthelminthiques des strongles gastrointestinaux des ovins et caprins : situation en 1991.

*Thèse de l'école nationale vétérinaire de Lyon*, N° 59, 144 p.

36 - BHATTACHARYYA B., SACKETT D.L., WOLFF J.. (1985) Tubulin hybrid dimers, and tubulin S.

*Journal of biological Chemistry* **260** 10208-10216, in LACEY, 1988.

37 - BHATTACHARYYA B., WOLFF J.. (1974) Promotion of fluorescence upon binding of colchicine to tubulin.

*Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* **71** 2627-2631, in LACEY, 1988.

38 - BHATTACHARYYA B., WOLFF J.. (1984) Immobilization-dependent fluorescence of colchicine.

*Journal of Biological Chemistry* **259** 11836-11843, in LACEY, 1988.

39 - BINDER L.J., FRANKFURTER A., REBHUN L.I.. (1986) Differential localization of MAP<sub>2</sub> and tau in mammalian neurons *in situ*.

*In : Dynamic Aspects of Microtubule Biology, Annals of the New York Academy of Sciences*, Editeur SOIFER R.D., New York Academy of Science, New York 466 145-166, in LACEY, 1988.

40 - BJORN H., ROEPSTORFF A., NANSEN P., WALLER P.J.. Anthelmintic resistance in Nematode parasites of pigs.

*In BORAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France). 219 p.*

41 - BJORN H., ROEPSTORFF A., WALLER P.J., NANSEN P.. (1990) Resistance to levamisole and cross-resistance between pyrantel and levamisole in *Oesophagostomum quadrispinulatum* and *Oesophagostomum dentatum* of pigs.

*Veterinary Parasitology* 37 (1) 21-30.

42 - BLIZZARD A., MARGIATTO G.M., MROZIK H., SHOOP W.L., FRANKSHUN R.A., FISHER M.H.. (1992) Synthesis and biological activity of 13-*epi*-Avermectins : potent anthelmintic agents with an increased margin of safety.

*Journal of Medicinal Chemistry* 35 (21) 3873-3878.

43 - BOERSEMA J.H., LEWING-VAN DER WIEL P.J., BORGSTEEDE F.H.M.. (1982) Benzimidazole resistance in a field Strain of *Haemonchus contortus* in the Netherlands.

*Veterinary Record* 110 203, in ROLFE, 1990.

44 - BONNE D., HEUSELE C., SIMON C., PANTALONI D.. (1985) 4',6-diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules.

*Journal of Biological Chemistry* 260 2819-2825, in LACEY, 1988.

- 45 - BORAY J.C.. (1986) Trematode infections of domestic animals.  
*In : Chemotherapy of Parasitic Diseases*, Editeurs : CAMPBELL W.C., REW R.S., Plenum Press, New York, 401-425, in LACEY, 1988.
- 46 - BORGAN T., BENOIT E., DELATOUR P. (1987) Pharmacokinetics of oxfendazole in goats: a comparaisn with sheep.  
*J. Vet. Pharmacol. Therap.* **10** 305-309, in BEUGNET, 1991.
- 47 - BORGERS M., DE NOLLIN S.. (1975) Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatement *in vivo*.  
*The Journal of Parasitology* **61** (1) 110-112.
- 48 - BORGSTEEDE F.H.M., DUYN S.P.J.. (1989) Lack of reversion of a Benzimidazole resistant strain of *Haemonchus contortus* after six years of Levamisole usage.  
*Research in Veterinary Science* **47** 270-272.
- 49 - BORISY G.G.. (1972) A rapid method for quantitative determination of microtubule protein using DEAE-cellulose filters.  
*Analytical Biochemistry* **50** 373-385, in LACEY, 1988.
- 50 - BOTERO D.R.. (1978) Chemotherapy of human intestinal parasitic diseases.  
*Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **18** 1-15, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 51 - BOYD J.E., BULLOCK N.W., CHAMPAGNE D.A., GOTTERDAM P.E., MORICI I.J., PLAISTED P.H., SPICER L.D., WAYNE R.S., ZULALIAN J.. (1969) Metabolism of L-tetramisole in rats.  
*In : 158<sup>Th</sup> National Meeting of the American Chemical Society*, New York, 7-12 september, in ARUNDEL *et al.*, 1967.
- 52 - BRENNER S.. (1974) The genetic of *Caenorhabditis elegans*.  
*Genetics* **77** 71-94, in LEWIS et BERBERICH, 1992.

53 - BRITT D.P.. (1986) Levamisole resistant Nematodes.

*Veterinary Record* 118 467, in TAYLOR, 1990.

54 - BROWN A.W.A., PAL R.. (1971) Nature and characterization of resistance.

*In Insecticide resistance in arthropods. 2nd Edition. World Health Organisation, Geneva. In MARTIN, 1990.*

55 - BROWN H.D., MATZUK A.R., ILVES I.R., *et al.* (1961) Antiparasitic drugs-IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic.

*Journal of the American Chemical Society* 83 1764-1765, in LACEY, 1988.

56 - BRYAN J..(1971) Vinblastine and microtubules : Introduction and isolation of crystals from sea urchin oocytes.

*Experimental Cell Research* 66 129-136, in LACEY, 1988.

57 - BRYANT C., BENNET E.M.. (1983) Observation on the fumarate reductase system in *Haemonchus contortus* and their relevance to anthelmintic resistance and to strain variations of energy metabolism.

*Molecular and Biochemical Parasitology* 7 281-292.

58 - BUEDING E.. (1952) *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 7 563-566, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

59 - BUNT J.A.. (1975) *Med. Land. Wageningen* 75 1-127, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

60 - BURG R.W., MILLER B.M., BAKER E.E., BIRNBAUM J., CURRIE J.A., HARMAN R., KONG V.L., MONAGHAN R.L., OLSON G., PUTTER I., TUNAC J.P., WALLICK H., STAPLEY E.O., OIWA R., OMURA S.. (1979) The action of avermectin on identified central neurons from *Helix* and its interaction with acetylcholine and gamma-aminobutyric acid responses.

*Antimicrobial Agents Chemotherapy* 15 316-367, in CAMPBELL, 1989.

61 - CABRAL F.R., SOBEL M.E., GOTTESMAN M.M.. (1980) CHO mutants resistant to colchicine, colcemid or griseofulvin have an altered  $\beta$ -tubulin. *Cell* 20 29-36, in LACEY, 1988.

62 - CALCOTT P.H., FATIG R.O.. (1984) Inhibition of chitin metabolism by Avermectin in susceptible organisms. *The Journal of Antibiotics* 37 (3) 253-259.

63 - CAMPBELL W.C.. (1986) The chemotherapy of parasitic infections. *The Journal of Parasitology* 72 (1) 45-61.

- 64 - CAMPBELL W.C.. (1989) *Ivermectine and Abamectine*.  
Editeur : Springer-Verlag, New-York, 363 p.
- 65 - CAMPBELL W.C.. (1990) Benzimidazoles : veterinary uses.  
*Parasitology Today* 6 (4) 130-133.
- 66 - CAMPBELL W.C.. (1993) Ivermectin, an antiparasitic agent.  
*Medicinal Research Reviews* 13 (1) 61-79.
- 67 - CARAFOLI E.. (1987) Intracellular calcium homeostasis.  
*A. Rev. Biochem.* 56 395-433, in AGARWAL *et al.*, 1992.
- 68 - CARMICHAEL I., VISSER R., SCHNEIDER D., SOLL M.. (1987) *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin.  
*Journal of the South African Veterinary Association* 58 93.
- 69 - CAWTHORNE R.J.G., CHEONG F.H.. (1984) Prevalence of Anthelmintic resistant Nematodes in sheep in South-east England.  
*Veterinary Record* 114 562, in ROLFE, 1990.
- 70 - CENTRE NATIONAL D'INFORMATION SUR LE MEDICAMENT HOSPITALIER. (1980)  
Flubendazole, FLUVERMAL<sup>®</sup>. N° 5, 12 p.
- 71 - CHABALA J.C., MROZIK H., TOLMAN R.L., ESKOLA P., LUSI A., PETERSON L.H., WOODS M.F., FISHER M.H.. (1980) Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent.  
*Journal of Medical Chemistry* 23 1134-1136, in CAMPBELL, 1989.
- 72 - CHALFIE M., THOMPSON J.N.. (1979) Organisation of neuronal microtubules in the Nematode *Caenorhabditis elegans*.  
*Journal of Cell Biology* 82 278-289, in LACEY, 1988.

- 73 - CHAN K.F.. (1952) Life cycle studies on the Nematode *Syphacia obvelata*.  
*American Journal of Hygiene* 56 14-21, in MOULIA, 1992.
- 74 - CHAN K.F.. (1955) The distribution of larval stages of *Aspicularis tetraptera* in the intestine of mice.  
*Journal for Parasitologie* 41 529-532, in MOULIA, 1992.
- 75 - CHANG S., OPPERMAN C.H.. (1991) *Molecular Biochemistry Parasitology* 49 205-214, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 76 - CHANG S., OPPERMAN C.H.. (1992) *Journal of Nematology* 24 148-155, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 77 - CLEMONS G.P, SISLER H.D.. (1971) localization of the site of action of fungitoxic benzomyl derivative.  
*Pesticide Biochemistry and Physiology* 1 32-43, in LACEY, 1988.
- 78 - CLEVELAND D.W., SULLIVAN K.F.. (1985) Molecular biology and genetics of tubulin.  
*Annual Review of Biochemistry* 54 331-365, in LACEY, 1988.
- 79 - COLES G.C.. (1988a) Drug resistance in ostertagiasis.  
*Veterinary Parasitology* 27 89-96.
- 80 - COLES G.C.. (1988b) Strategies for control of anthelmintic-resistant Nematodes of ruminants.  
*Journal of the American Veterinary Medical Association* 192 (3) 330-334.
- 81 - COLES G.C.. (1990) Recent advances in laboratory models for evaluation of helminth chemotherapy.  
*British Veterinary Journal* 146 (2) 113-119.

- 82 - COLES G.C., EAST J.M., JENKINS S.N.. (1975) The mechanism of action of the anthelmintic levamisole.  
*Gen. Pharmacol.* **6** 309-313, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 83 - COLES G.C., FOLTZ S.D., TRITSCHLER J.P.. (1989) Motility response of Levamisole/Benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* larvae.  
*Veterinary Parasitology* **31** 253-257.
- 84 - COLES G.C., HONG C., HUNT K.R.. (1991) Benzimidazole resistant Nematodes in sheep in southern England.  
*The Veterinary Record* **1** (1) 44.
- 85 - COLES G.C., SIMPKIN K.G.. (1977) Resistance in Nematode eggs to the ovicidal activity of benzimidazoles.  
*Research in Veterinary Science* **22** 386-387, in BEUGNET, 1991.
- 86 - COLIN H.W., MICHAEL T.M.. (1983) Esterase : problems of identification and classification.  
*Biochemical Pharmacology* **32** 3265-3269, in MOUKRIM, 1987.
- 87 - COLLINS C.A., VALLEE R.B.. (1987) Temperature-dependent reversible assembly of taxol-treated microtubules.  
*Journal of Cell Biology* **105** 2847-2854, in LACEY, 1988.
- 88 - COLQUHOUN L., HOLDEN-DYE L., WALKER R.J.. (1991) The pharmacology of cholinceptors on the somatic muscle cells of the parasitic Nematode *Ascaris suum*.  
*Journal of Experimental Biology* **158** 509-530, in MARTIN R.J., 1992
- 89 - COLQUHOUN D., SAKMANN B.. (1985) Fast events in single channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate.  
*Journal of Physiology* **369** 501-557, in MARTIN R.J., 1992.

- 90 - CONDER G.A., JOHNSON S.S., GUIMOND P.M., GEARY T.G., LEE B.L., WINTERROWD C.A., LEE B.H., DI ROMA P.J.. (1991) Utility of *Haemonchus contortus*/JIRD (*Meriones unguiculatus*) model for studying resistance to Levamisole. *The Journal of Parasitology* 77 (1) 83-86.
- 91 - CONWAY D.P.. (1964) Variance in the effectiveness of Thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *American Journal of Veterinary research* 25 105-106, in LACEY, 1988.
- 92 - COOK G.C.. (1990) Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiases : indications and efficacy. *Parasitology Today* 6 (4) 133-136.
- 93 - COOK J.W., LOUDON J.D.. (1951) The tropolones. *Quarterly reviews (Chemical society)* 5 99-129, in LACEY, 1988.
- 94 - CORNWELL R.L.. (1966) Controlled laboratory trials in sheep with the anthelmintic pyrantel tartrate. *Vet. Rec.* 79 590-595, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 95 - CORREIA J.J., BATY L.T., WILLIAMS R.C.. (1987)  $Mg^{2+}$  dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. *Journal of Biological Chemistry* 262 17278-17284, in LACEY, 1988.
- 96 - CORTESE F., BHATTACHARYYA B., WOLFF J.. (1977) Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. *Journal of Biological chemistry* 252 1134-1140, in LACEY, 1988.
- 97 - CRAIG T.M., *et al.* (1992) *Veterinary Parasitology* 41 329-333, in SHOOP, 1993.

98 - CROOM H.B., CORREIA J.J., WILLIAMS R.C.. (1986) The effects of elevated pH and high salt concentrations on tubulin.

*Archives of Biochemistry and Biophysics* 249 397-406, in LACEY, 1988.

99 - DALY J.C.. (1990) Resistance management strategies : theory and practice.

*In : Resistance Management in Parasites of Sheep*, Editeurs : MCKENZIE J.A., MARTIN P.J., ARUNDEL J.H., 72-83. Australian Wool Corporation, Melbourne, in MARTIN, 1990.

100 - DASH K.M. (1985) Differential efficacy of Levamisole and Oxfendazole against male and female *Trichostrongylus colubriformis*.

*The Veterinary Record* 117 502-503.

101 - DAVIDSE L.C., FLACH W.. (1977) Differential binding of methyl benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*.

*Journal of Cell Biology* 72 174-193, in LACEY, 1988.

102 - DAVIS A.. (1973) Drug treatment in intestinal helminthiases.

*World Health Organization*, Geneva, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

103 - DAVIS C., GULL K.. (1983) Protofilament number in microtubules in cells of two parasitic Nematodes.

*Journal of Parasitology* 69 1094-1099, in LACEY, 1988.

104 - DAWSON P.J., GUTTERIDGE W.E., GULL K.. (1983) Purification and characterisation of tubulin from the parasitic Nematode *Ascaridia galli*.

*Molecular and Biochemical Parasitology* 7 267-277, in LACEY, 1988.

105 - DAWSON P.J., GUTTERIDGE W.E., GULL K.. (1984) A comparison of the interaction of anthelmintic benzimidazoles with tubulin isolated from mammalian tissue and the parasitic Nematode *Ascaridia galli*.

*Biochemical Pharmacology* 3 1069-1074, in LACEY, 1988.

106 - DAY, KIM, JOHNSON.. (1989) *Abstract of Caenorhabditis elegans Meeting*, Cold Spring Harbor, in LE JAMBRE, 1990.

107 - DEBORD J.. (1983) Etude microcolorimétrique et spectrophotométrique de l'inhibition de la butyryl-cholinestérase par quelques phosphoramides aliphatiques.

*Thèse de doctorat d'état ès Chimie Appliquée*. Université de Poitiers, 67 p., in MOUKRIM, 1987.

108 - DEL CASTILLO J.. (1969) Pharmacology of Nematoda. In : FLORKIN M., SCHEER B.T., *Chemical Zoology*, Academic Press, New York, 3 521-554, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

109 - DETRICH H.W., WILLIAMS R.C., MacDONALD T.L., WILSON L., PUETT D.. (1981) Changes in the circular dichroic spectrum of colchicine associated with its binding to tubulin.

*Biochemistry* 20 5999-6005, in LACEY, 1988.

110 - DE VANEY J.A., CRAIG T.M., ROWE L.D.. (1992) Resistance to Ivermectin by *Haemoncus contortus* in goats and calves.

*International Journal for Parasitology* 22 (3) 369-376.

111 - DOBSON R.J., BARNES E.H., BIRCLIJIN S.D., GILL J.H.. (1992) The survival of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species.

*International Journal for Parasitology* 22 (7) 1005-1008.

112 - DOBSON R.J., DONALD A.D., WALLER P.J., SNOWDON K.L.. (1986) An egg-hatch assay for resistance to levamisole in Trichostrongyloid Nematode parasites.

*Veterinary Parasitology* 19 77-84, in BEUGNET, 1991.

- 113 - DOBSON R.J., GRIFFITHS D.A., DONALD A.D. WALLER P.J.. (1987) A genetic model describing the evolution of levamisole resistance in *Trichostrongylus colubriformis*, a Nematode parasite of sheep.  
*IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology* 4 279-293, in MARTIN, 1990.
- 114 - DORCHIES P., NICOLAS J.A., GEVREY J., MAGE C.. (1990) Vermifugation du mouton: prévenir les risques d'apparition des chimiorésistances.  
*Revue de Médecine Vétérinaire* 141 (5) 379-381.
- 115 - DREXLER G., SIEGHART W.. (1984) Properties of high affinity binding site for tritium-labeled avermectin B<sub>1a</sub>.  
*European Journal of Pharmacology* 99 269-277, in CAMPBELL, 1989.
- 116 - DRISCOLL M., DEAN E., REILLY E., BERGHOLZ E., CHALFIE M.. (1989) Genetic and molecular analysis of *Caenorhabditis elegans*  $\beta$ -tubulin that conveys benzimidazole sensitivity.  
*Journal of Cell Biology* 109 2993-3003, in KÖHLER, 1990.
- 117 - DRUBIN D., KOBAYASHI S., KIRSCHNER M.. (1986) Association of tau protein with microtubules in living cells.  
*In : Dynamic Aspects of Microtubule Biology, Annals of the New York Academy of Sciences*, Editeur SOIFER R.D., New York Academy of Science, New York 466 257-268, in LACEY, 1988.
- 118 - DRUDGE J.H., LELAND S.E., WYANT Z.N.. (1957) Strain variation in the response of sheep Nematodes to the action of Phenothiazine. I. Studies of mixed infections in experimental animals.  
*American Journal for Veterinary Research* 18 133-141.
- 119 - DRUDGE J.H., LELAND S.E., WYANT Z.N., ELAM G.W.. (1954) Observations on the effectiveness of phenothiazine in the control of gastro-intestinal Nematodes of sheep.  
*Ann. Rep. Direct. Kentucky Agricultural Experiment Station* 56.

- 120 - DRUDGE J.H., SZANTO J., WYANT Z.N., ELAM G.W.. (1964) Field studies on parasite control of sheep : comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine. *American Journal of Veterinary Research* 25 1512-1518, in ROLFE, 1990.
- 121 - DRUDGE J.H., LELAND S.E., WYANT Z.N., ELAM G.W., HUTZLER L.B.. (1959) Strain variation in the response of sheep Nematodes to the action of phenothiazine. IV. Efficacy of single therapeutic doses for removal of *Haemonchus contortus*. *American Journal of Veterinary research* 20 670-676, in ROLFE, 1990.
- 122 - DUCE I.R., SCOTT R.H.. (1983) GABA sensitivity in the distal bundles of the locust extensor tibiae muscle. *Journal of Physiology* 343 32 p.
- 123 - DUCE I.R., SCOTT R.H.. (1985) Actions of dihydroavermectin B<sub>1a</sub> on insect muscle. *British Journal of Pharmacology* 85 395-401, in CAMPBELL, 1989.
- 124 - DURRIEU C., BERNIER-VALENTIN F., ROUSSET B.. (1987) Binding of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase to microtubules. *Molecular and cellular biochemistry* 74 55-65, in LACEY, 1988.
- 125 - DUSTIN P.. (1984) In : *Microtubules*, Editor : Springer, Berlin, in LACEY, 1988.
- 126 - ECHEVARRIA F.A.M., GENNERI S.M., TAIT A.. (1992) *Veterinary Parasitology* 44 87-95, in SHOOP, 1993.
- 127 - ECHEVARRIA F.A.M., TRINDADE G.N.P.. (1989) Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to Ivermectin in Brazil : a preliminary report. *Veterinary Record* 124 147-148.
- 128 - EDWARDS G., BRECKENRIDGE A.M.. (1988) Clinical pharmacokinetics of anthelmintic drugs. *Clinical Pharmacokinetics* 15 67-93.

129 - EGERTON J.R.. (1969) The ovicidal and larvicidal effect of thiabendazole on various helminth species.

*Texas Reports of Biology and Medicine* 27 (2) 561-580, in LACEY, 1988.

130 - EGERTON J.R., OSTLIND D.A., BLAIR L.S., EARY D.H., SUHAYDA D., CIFELLI S., RIEK R.F., CAMPBELL W.C.. (1979) Avermectins, new family of potent anthelmintic agents : efficacy of the B<sub>1a</sub> component.

*Antimicrobials Agents Chemotherapy* 15 372-378, in CAMPBELL, 1989.

131 - ELLIS C., NATHWANI B., MORRICE N., PARKER P., EVANS F.J., AITKEN A.. (1987) Ivermectin : an inhibitor of protein kinase C- : a potential target enzyme for onchocerciasis chemotherapy.

*British Journal of Pharmacology* 91 22 p., in CAMPBELL, 1989.

132 - EMERY D.L., WAGLAND B.M.. (1991) Vaccines against gastrointestinal Nematode parasites of ruminants.

*Parasitology Today* 7 (12) 347-349.

133 - ENOS A., COLES G.C.. (1990) Effect of benzimidazole drugs on tubulin in benzimidazole resistant and susceptible strains of *Caenorhabditis elegans*.

*International Journal for Parasitology* 20 161-167, in KÖHLER, 1990.

134 - ENZIE F.D., COLGLAZIER M.L., WHITMORE G.E., THOMPSON D.F.. (1960) Effectiveness of three management systems on parasitism in lamb. III. Resistance of *Haemonchus contortus* to phenothiazine.

*Journal of Parasitology* 46 (41) 121, in ROLFE, 1990.

135 - EYRE P.. (1970) Some pharmacodynamic effects of the Nematodes : methyridine, tetramisole and pyrantel.

*J. Pharm. Pharmacol.* 22 26-36, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

- 136 - FARRELL K.W.. (1982) Isolation of tubulin from non-neuronal sources.  
*In : Methods of Enzymology* 85 385-393 Editeurs : FREDERIKSON D.W., CUNNINGHAM L.W., Academic Press, New York, *in* LACEY, 1988.
- 137 - FELLOUS A., LUDUENA R.F., PRASAD V., JORDAN M.A., ANDERSON W., OHAYON R., SMITH P.T.. (1985) Effect of tau and MAP<sub>2</sub> on the interaction of maytansine with tubulin : inhibitory effect of maytansine on vinblastine-induced aggregation of tubulin.  
*Cancer Research* 45 5004-5010, *in* LACEY, 1988.
- 138 - FEST C., SCMIDT K.J.. (1973) The chemistry of organophosphorus pesticides.  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 339 p., *in* MOUKRIM, 1987.
- 139 - FISHER M.H.. (1985) *Recent advances in the Chemistry of insect Control*. Editeurs : JANES N.F., *Royal Society of Chemistry*. Special publication No. 53, p. 53, *in* CAMPBELL, 1989.
- 140 - FITZGERALD T.J.. (1976) Molecular features of colchicine associated with antimitotic activity and inhibition of tubulin polymerization.  
*Biochemical Pharmacology* 25 1383-1387, *in* LACEY, 1988.
- 141 - FORBES L.S.. (1972) Some aspect of the pharmacology of pyrantel in the dog.  
*New Zealand Veterinary Journal* 20 (6) 83-85.
- 142 - FORSYTH K.P., MITCHELL G.F., COPEMAN D.B.. (1984) *Onchocerca gibsoni* : increase of circulating egg antigen with chemotherapy in bovines.  
*Experimental Parasitology* 58 41-55, *in* LACEY, 1988.
- 143 - FRIEDMAN P.A., PLATZER E.G.. (1978) Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubuline.  
*Biochimica Biophysica Acta* 544 605-614.

144 - FRIEDMAN P.A., PLATZER E.G.. (1980) Interaction of anthelmintic Benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin.

*Biochimica Biophysica Acta* 630 271-278.

145 - FRITZ L.C., WANG C.C., GORIO A.. (1979) Avermectin B<sub>1a</sub> irreversibly blocks presynaptic potentials at the lobster neuromuscular junction by reducing muscle membrane resistance.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 2062-2066, in CAMPBELL, 1989.

146 - FUJIMURA M., KAMAKURA T., INOUE H., INOUE S., YAMAGUCHI I.. (1992) Sensitivity of *Neurospora crassa* to Benzimidazoles and *N*-Phenylcarbamates : effect of amino acid substitutions at position 198 in  $\beta$ -tubuline.

*Pesticide Biochemistry and Physiology* 44 165-173.

147 - GARCIA E.G.. (1976) Treatment for trichuriasis with oxantel.

*American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 25 914-9154, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

148 - GARLAND D.L.. (1978) Kinetics and mechanism of colchicine binding to tubulin : evidence for ligand-induced conformation change.

*Biochemistry* 17 4266-4272, in LACEY, 1988.

149 - GEORGHIOU G.P.. (1972) The evolution of resistance to pesticides.

*Annual Review of Ecology and systematics* 3 133-168, in MARTIN, 1990.

150 - GETTINBY G., HAZELWOOD S., ARMOUR J.. Computer models applied to drug resistance in parasites.

In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

- 151 - GEVREY J., GEVREY T.. (1974) Culture in vitro d'*Haemonchus contortus* jusqu'au stade imaginal (stade 5).  
*Annales de Recherche Vétérinaire* 5 (4) 451-164, in BEUGNET, 1991.
- 152 - GEVREY J., ROBIN B.. (1984) Efficacité de l'ivermectine sur deux souches de strongles digestifs d'origine ovine. Comparaison avec le Thiabendazole et le fenbendazole.  
*Sci. Vet. Med. Comp.* 6 (4) 145-151, in BEUGNET, 1991.
- 153 - GILL J.H., et al.. (1991) *International Journal for Parasitology* 21 771-776, in SHOOP, 1993.
- 154 - GILL J.H., LACEY E.. (1992) The kinetics of mebendazole binding to *Haemonchus contortus* tubulin.  
*International Journal for Parasitology* 22 (7) 939-946.
- 155 - GILL H.S., WATSON D.L., BRANDON M.R.. (1993) Monoclonal antibody to CD4<sup>+</sup> T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep.  
*Immunology* 78 43-49.
- 156 - GIORDANO D.J., TRITSCHLER J.P., COLES G.C.. (1988) *Veterinary Parasitology* 30 139-148, in SHOOP, 1993.
- 157 - GOH S.L., DÁVEY K.G.. (1976) *Canadian Journal for Zoology* 54 752-771, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 158 - GORDNIER P.M., BREZNER J., TANENBAUM S.W.. (1987) Chitin metabolism : not target of avermectin/milbemycin activity in insects.  
*J. Antibiot.* 40 110-112, in CAMPBELL, 1989.
- 159 - GOTTSCHALL D.W., THEODORIDES V.J., WANG R.. (1990) The metabolism of Benzimidazole anthelmintics.  
*Parasitology Today* 6 (4) 115-124.

160 - GRAHAM D., PFEIFFER F., BETZ H.. (1982) Avermectin B<sub>1a</sub> inhibits the binding of strychnine to the glycine receptor of rat spinal cord.  
*Neurosci. Let.* 29 173-176, in CAMPBELL, 1989.

161 - GRANT W.N.. (1992) Transformation of *Caenorhabditis elegans* with genes from parasitic Nematode.  
*Parasitology Today* 8 (10) 344-346.

162 - GRASSE P.P., DOUMENC D.. (1990) Abrégé de zoologie des Invertébrés.  
*Edition Masson, troisième édition*, 263 p.

163 - GRAZIANI G., MARTIN G.L.. (1977) Pharmacokinetic studies on levamisole.  
*Drugs Exp. Clin. Res.* 2 221-223, in ARUNDEL *et al.*, 1967.

164 - GREEN P.E., FORSYTH B.A., ROWAM K.J., PAYNE G.; (1981) The isolation of a field strain of *Haemonchus contortus* in Queensland showing multiple anthelmintic resistance.  
*Australian Veterinary Journal* 57 79-84, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

165 - GREENE B.M., TAYLOR H.R., CUPP E.W., MURPHY R.P., WHITE A.T., AZIZ M.A., SCHULTZ-KEY H., D'ANNA S.A., NEWLAND H.S., GOLDSCHMIDT L.P., AUER C., HANSON A.P., FREEMAN S.V., REBER E.W., WILLIAMS P.N.. (1985) Comparison of ivermectin and diethylcarbamazine in the treatment of onchocerciasis.  
*New England Journal of Medicine.* 313 133-138, in CAMPBELL, 1989.

166 - GUIDOTTI A., TOTTANO G., COSTA E.. (1978) An endogenous protein modulates the affinity of GABA and Benzodiazepine receptors in rat brain.  
*Nature* 275 553-555, in CAMPBELL, 1989.

167 - GUILLHAM R.J., OBENDORF D.L.. (1985) Therapeutic failure of levamisole in dairy goats.  
*Australian Veterinary Journal* 62 426-427, in ROLFE, 1990.

168 - GUPTA R.S.. (1986) Cross resistance of nocodazole-resistant mutants of CHO cells toward other microtubule inhibitors : similar mode of action of benzimidazole carbamate derivatives and NSC 181928 and TN-16.

*Molecular Pharmacology* **30** 142-148, in LACEY, 1988.

169 - GUPTA R.S., GUPTA R.. (1984) Mutants of Chinese hamster ovary cells affected in two different microtubule-associated proteins.

*Journal of Biological chemistry* **259** 1882-1890, in LACEY, 1988.

170 - HAINS F.O., DICKERSON R.M., WILSON L., OWELLEN R.J.. (1978) Differences in the binding properties of vinca alkaloids and colchicine to tubulin by varying protein sources and methodology.

*Biochemical Pharmacology* **27** 71-76, in LACEY, 1988.

171 - HALL C.A., KELLY J.D., WHITLOCK H.V., MARTIN J.C.A.. (1981) Five generations of selection with benzimidazole and non-benzimidazole anthelmintics against benzimidazole-resistant strains of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia sp* in sheep.

*Res. Vet. Sci* **30** 138-142, in BEUGNET, 1991.

172 - HALL C.A., RITCHIE L., KELLY J.D.. (1982) Effect of removing anthelmintic selection pressure on the benzimidazole resistance status of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep.

*Research in Veterinary Science* **33** 54-57, in MARTIN, 1990.

173 - HALL C.A., RITCHIE L., KELLY J.D.. (1983) Changes in resistance in mixed infections of susceptible and benzimidazole resistant strains of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* passaged in sheep.

*Research in Veterinary Science* **34** 55-57, in BEUGNET, 1991.

174 - HAMEL E., LIN C.M.. (1981) Glutamate-induced polymerisation of tubulin : Characteristics of the reaction and application to the large-scale purification of tubulin.

*Archives of Biochemistry and Biophysics* **209** 29-40, in LACEY, 1988.

175 - HARROW I.D., GRATION K.A.F.. (1985) Mode of action of the anthelmintics Morantel, Pyrantel and Levamisole on muscle cell membrane of the Nematode *Ascaris suum*. *Pesticide Science* **16** 662-672.

176 - HASSONI A.A., KERKUT G.A., WALKER R.J.. (1988) Evidence that Levamisole, Pyrantel, Morantel, Amidantel, deacyled Amidantel and Hycanthone may act on acetylcholine receptors of central neurones of *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **91c** (2) 525-533.

177 - HEAD J., LEE L.L., FIELD D.J., LEE J.C.. (1985) Equilibrium and rapid kinetic studies on nocodazole-tubulin interaction. *Journal of Biological Chemistry* **266** 11060-11066, in LACEY, 1988.

178 - HENNESSY D.R.. (1985) Manipulation of anthelmintic pharmacokinetics. *In : Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs*, Editeurs : ANDERSON N., WALLER P.J., CSIRO Division of Animal Health, Glebe, NSW, 79-81, in LACEY, 1988.

179 - HERLICH H., REW R.S., COLGLAZIER M.L.. (1981) Inheritance of cambendazole resistance in *Haemonchus contortus*. *American Journal of Veterinary Research* **42** 1342-1344, in MARTIN, 1990.

180 - HESSE J., MARUTA H., ISENBERG G.. (1985) Monoclonal antibodies localize the exchangeable GTP-binding site in  $\beta$  and not  $\alpha$ -tubulin. *FEBS Letters* **179** 91-95, in LACEY, 1988.

181 - HIMES R.H., BURTON P.R., GAITO J.M.. (1977) Dimethyl sulphoxide-induced self-assembly of tubulin lacking associated proteins. *Journal of Biological Chemistry* **252** 6222-6228, in LACEY, 1988.

182 - HINMAN N.D., MORGAN J.L., SEEDS N.W., CANN J.R.. (1973) Isolation of brain tubulin by affinity Chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **52** 752-758, in LACEY, 1988.

- 183 - HOEBEKE J., NIJEN G., DE BRABANDER M.. (1976) Interaction of oncodazole (R17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* **69** 319-324, in LACEY, 1988.
- 184 - HOLDEN-DYEL., WALKER R.J.. (1990) Avermectin and avermectin derivatives are antagonists at the 4-aminobutyric acid (GABA) receptors on the somatic muscle cells of *Ascaris* ; is this the site of anthelmintic action ?  
*Parasitology* **101** 265-271, in MARTIN R.J., 1992.
- 185 - HORGATH-SCOTT R.S. *et al.*. (1973) *International Journal for Parasitology* **3** 735-741, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 186 - HORWITZ S.B., PARNES J., SCHIFF P.B., MANFREDI J.J.. (1982) Taxol : a new probe for studying the structure and function of microtubules.  
*Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology* **46** 219-226, in LACEY, 1988.
- 187 - HOWELLS R.E., JOHNSTONE I.. (1991) *Caenorhabditis elegans* a model for parasitic Nematodes.  
*Parasitology Today* **7** (9) 224-226.
- 188 - HUANG A.B., LIN C.M., HAMEL E.. (1985) Maytansine inhibits nucleotide binding at the exchangeable site on tubulin.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* **128** 1239-1246, in LACEY, 1988.
- 189 - HUBERT J.. (1980) Bilans parasitaires : possibilité de congélation des tractus digestifs avant les examens.  
*Recueil de Médecine Vétérinaire* **156** (1) 47-50, in BEUGNET, 1991.
- 190 - HUBERT J., KERBOEUF D.. (1992) *Veterinary Record* **130** 442-446, in SHOOP, 1993.

- 200 - HUBERT J., KERBOEUF D., NICOLAS J.A., DUBOST G., GAYAUD C.. (1991) Résistance des strongles gastro-intestinaux aux Benzimidazoles chez les petits ruminants en Limousin.  
*Recueil de Médecine Vétérinaire* 167 (2) 135-140.
- 201 - HUTCHINSON G.W., PROBERT A.J.. (1972) *Experimental Parasitology* 32 109-116.
- 202 - IKEDA Y., STEINER M.. (1976) Isolation of platelet microtubule protein by an immunosorptive method.  
*Journal of Biological Chemistry* 251 6135-6141, in LACEY, 1988.
- 203 - IKEDA Y., STEINER M.. (1978) Sulfhydryls of platelet tubulin : their role in polymerisation and cochicine binding.  
*Biochemistry* 17 3454-3459, in LACEY, 1988.
- 204 - IRELAND C.M., CLAYTON L., GUTTERIDGE W.E., POGSON C.I., GULL K.. (1982) Identification and drug binding capabilities of tubulin in the Nematode *Ascaridia galli*.  
*Molecular and Biochemical Parasitology* 6 45-53, in LACEY, 1988.
- 205 - ISHIKO J., INAGAKE C., TAKAORI S.. (1985) Effects of avermectin B<sub>1a</sub> and picrotoxin on striatal release of dopamine with reference to replacement of extracellular chloride with nitrate.  
*Neuropharmacologia* 24 1147-1154, in CAMPBELL, 1989.
- 206 - JACKSON F., COOP R.L., JACKSON E.. (1991) Anthelmintic resistant Nematodes in goats.  
*The Veterinary Record* 13 39-40.
- 207 - JACKSON F., JACKSON E., COOP R.L.. (1992) *Research in Veterinary Science* 53 371-374, in SHOOP, 1993.
- 208 - JEANNIN P.C., et al.. (1990) *Veterinary Record* 126 624-625, in SHOOP, 1993.

- 209 - JENKINS D.C.. (1982) *In vitro* screening tests for anthelmintics.  
*In : Animal Models in Parasitology*, Editeur : OWEN D.G., MacMillan Press, London, 173-186, in LACEY, 1988.
- 210 - JOHANSEN M.V.. (1989) An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in Nematode parasites of domestic livestock.  
*Veterinary Research Communications* 13 (6) 455-466.
- 211 - JOHN B.. (1957) The chromosomes of zooparasites II.  
*Oswaldocruzia filiformis* (Nematoda : *Trichostrongylidae*).  
*Chromosoma* 9 61-68, in MARTIN, 1990.
- 212 - JOHNSON C.D., DAY, KIM.. (1989) Abstract of *Caenorhabditis elegans* Meeting, Cold Spring Harbor, in LE JAMBRE, 1990.
- 213 - JOHNSON C.D., RUSSEL R.L.. (1983) *Journal of Neurochemistry* 41 30-46, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 214 - JOHNSON C.D., STRETTON A.O.W.. (1980) *In : Nematodes as Biological Models*. 1 159-195, Editeur : ZUCKERMAN B. M., Academic Press, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 215 - JORDI R.. (1980) Studies of resistance to anthelmintics in sheep *Trichostrongyles*.  
*Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 122 679, in ROLFE, 1990.
- 216 - KARKHOFF-SCHWEIZER R., KNULL H.R.. (1987) Demonstration of tubulin-glycolytic enzyme interactions using a novel electrophoretic approach.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* 146 827-831, in LACEY, 1988.
- 217 - KASS I.S., STRETTON A.O.W., WAND C.C.. (1984) The effects of avermectin and drugs related to acetylcholine and 4-aminobutyric acid on neurotransmission in *Ascaris suum*.  
*Molecular and Biochemical Parasitology* 13 213-255, in CAMPBELL, 1989.

- 218 - KASS I.S., WANG C.C., WALROND J.P., STRETTON A.O.W..(1980) Avermectin B<sub>1a</sub>, a paralyzing anthelmintic that affects interneurons and inhibitory motoneurons in *Ascaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 6211-6215, in CAMPBELL, 1989.
- 219 - KAWALEK J.C., REW R.S., HEAVNER J.. (1984) Glutathione-S-transferase, a possible drug-metabolising enzyme, in *Haemonchus contortus* : comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. *International Journal for Parasitology* 14 173-175, in LACEY, 1988.
- 220 - KEATES R.A.B., SARANGI F., LING V.. (1981) Structural and functional alterations in microtubule protein from chinese hamster ovary cell mutants. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 78 5638-5642, in LACEY, 1988.
- 221 - KELLY J.D., HALL C.A., (1979) Resistance of animal helminths to anthelmintics. *Adv. Pharmacol. Chemotherapy* 16 89-128, in BEUGNET, 1991.
- 222 - KELLY J.D., WHITLOCK H.V., THOMPSON H.G., HALL C.A., MARTIN I.C.A., LE JAMBRE L.F.. (1978) Physiological characteristics of free-living and parasitic stages of strains of *Haemonchus contortus* susceptible and resistance to benzimidazole anthelmintics. *Research in Veterinary Science* 25 376-385, in BEUGNET, 1991.
- 223 - KEMP G.K., SMITH C.F.. (1982) Anthelmintic resistance survey in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 30 141-144, in ROLFE, 1990.
- 224 - KERBOEUF D.. (1986) Les strongyloses gastro-intestinales ovines : épidémiologie et moyen de lutte. *Synthèse d'un ensemble de conférences prononcées à l'occasion des journées INRA-GTV, 27 et 28 novembre 1986, Tours.*
- 225 - KERBOEUF D., HUBERT J.. (1985) Benzimidazole resistance in field strains of Nematodes from goats in France. *Veterinary Record* 116 133, in ROLFE, 1990.

226 - KERBOEUF D., HUBERT J.. (1990) Efficacité comparée de trois famille d'anthelminthiques vis-à-vis de strongles résistants aux benzimidazoles.

*Recueil de Médecine Vétérinaire* 166 (8/9) 771-775.

227 - KETTLE P.R., VLASSOF A., REID T.C., HORTON C.T.. (1983) A survey of Nematode control measures used by milking goat farmers and of Anthelmintic resistance on their farms.

*New Zealand Veterinary Journal* 31 139, in ROLFE, 1990.

228 - KIRSCH R., SCHLEICH H.. (1982) Morphological changes in Trichostrongylid eggs after treatment with fenbendazole.

*Veterinary Parasitology* 11 375-380, in LACEY, 1988.

229 - KITA K.. (1992) Electron-transfer complexes of mitochondria in *Ascaris suum*.

*Parasitology Today* 8 (5) 155-159.

230 - KNOWLES C.O., CASIDA J.E.. (1966) *Journal of Agricultural Food Chemistry* 14 566-572, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

231 - KÖHLER P.. The molecular basis of drug resistance in helminths.

In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

232 - KÖHLER P., BACHMANN R.. (1981) Intestinal tubulin as possible target for chemotherapeutic action of mebendazole in parasitic Nematodes.

*Molecular and biochemical Parasitology* 4 325-336, in LACEY, 1988.

233 - KOCHA T., FUKUDA T., ISOBE T., OKUYAMA T.. (1986) Hydrophobic chromatography of tubulin on immobilised colchicine columns with various species.

*Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 34 3791-3802, in LACEY, 1988.

- 234 - KOLSON D.L., RUSSELL R.L.. (1985) *Journal of Neurogenetic* 2 93-110, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 235 - KOTANI S., MUROFUSHI H., NISHIDA E., SAKAI H.. (1984) 33K protein-an inhibitory factor of tubulin polymerisation in porcine brain.  
*Journal of Biochemistry* 94 959-969, in LACEY, 1988.
- 236 - LACEY E.. (1988) The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles.  
*International Journal for Parasitology* 18 (7) 885-936.
- 237 - LACEY E.. (1990) Mode of action of Benzimidazoles.  
*Parasitology Today* 6 (4) 112-115.
- 238 - LACEY E., EDGAR J.A., CULVENOR C.C.J.. (1987) Interaction of phomopsin A and related compounds with purified sheep brain tubulin.  
*Biochemical Pharmacology* 36 2133-2138, in LACEY, 1988.
- 239 - LACEY E., PRICHARD R.. (1986) Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*.  
*Molecular and Biochemical Parasitology* 19 171-181.
- 240 - LACEY E., REDWIN J.M., GILL J.H., DEMARGHERITI V.M., WALLER P.J.. (1990) A larval development assay for the simultaneous deyection of broad spectrum anthelmintic resistance.  
In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.
- 241 - LACEY E., SNOWDON K.L.. (1988) A routine Diagnostic assay for the detection of Benzimidazole resistance in parasitic Nematodes using tritiated Benzimidazole carbamates.  
*Veterinary Parasitology* 27 309-324.

- 242 - LACEY E., WATSON T.R.. (1985) Activity of benzimidazole carbamates against L1210 mouse leukaemia cells : correlation with *in vitro* tubulin polymerisation assay. *Biochemical Pharmacology* 34 3603-3605, in LACEY, 1988.
- 243 - LACLETTE J.P., GUERRA G., ZETINA C.. (1980) Inhibition of tubulin polymerisation by mebendazole. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 92 417-423, in LACEY, 1988.
- 244 - LAI C.J., HARRIS B.G., COOK P.F.. (1992) Mechanism of activation of the NAD-Malic enzyme from *Ascaris suum* by fumarate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 299 (2) 214-219.
- 245 - LEE D.L.. (1962) *Parasitology* 52 241-260, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 246 - LEE J.C., FIELD D.J., GEORGE H.J., HEAD J.. (1986) Biochemical and chemical properties of tubulin sub-species. *In : Dynamic Aspects of Microtubule Biology, Annals of New York Academy of Sciences. The New York Academy of Sciences* 466 111-128, in LACEY, 1988.
- 247 - LEE R.M., HODSDEN M.R.. (1963) *Biochemistry and Pharmacology* 12 1241-1252, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 248 - LEE J.C., TWÉEDY N., TIMASHEFF S.N.. (1978) *In vitro* reconstitution of calf brain microtubules : effects of macromolecules. *Biochemistry* 16 1754-1764, in LACEY, 1988.
- 249 - LEFEBVRE, (1981) références inconnues, cité dans BEUGNET, 1991.
- 250 - LE JAMBRE L.F.. (1976) Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in Nematodes. *Veterinary Parasitology* 2 385-391, in LACEY, 1988.

251 - LE JAMBRE L.F.. (1985) Genetic aspects of anthelmintic resistance in Nematodes. In ANDERSEN N., WALLER P.J.. *Resistance in Nematodes to anthelmintic drugs*, Editeur: CSIRO, Australie ; Chapitre 9, p. 97-106, in BEUGNET, 1991.

252 - LE JAMBRE L.F.. (1990) Molecular biology and anthelmintic resistance in parasitic Nematodes.

In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

253 - LE JAMBRE L.F., MARTIN D.J., JARRET R.G.. (1982) Comparison of changes in resistance of *Haemonchus contortus* eggs following with drawl of thiabendazole selection. *Res. Vet. Sci.* 32 39-45, in BEUGNET, 1991.

254 - LE JAMBRE L.F., PRICHARD P.K., HENNESSY D.R., LABY R.H.. (1981) Efficiency of oxfendazole administered as a single dose or in a controlled release capsule against Benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*.

*Research in Veterinary Science* 31 289-294.

255 - LE JAMBRE L.F., MARTIN P.J.. (1979) Effectiveness of morantel tartrate and naphthalophos against levamisole resistant *Ostertagia* in sheep.

*Veterinary Science Communications* 3 153-158, in MARTIN *et al.*, 1990.

256 - LE JAMBRE L.F., ROYAL W.M., MARTIN P.J.. (1979) The inheritance of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*.

*Parasitology* 78 139-143, in MARTIN, 1990.

257 - LEWIS J.A., BERBERICH S.. (1992) A detergent-solubilized nicotinic Acetylcholine receptor of *Caenorhabditis elegans*.

*Brain Research Bulletin* 29 667-674.

258 - LEWIS J.A., ELMER J.S., SKIMMING J., McLAFFERTY S., FLEMING J., McGEE T.. (1987b) Cholinergic receptor mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience* 7 3059-3071, in LEWIS et BERBERICH, 1992.

259 - LEWIS J.A., FLEMING J.T., McLAFFERTY S., MURPHY H., WU C.. (1987a) The levamisole receptor, a cholinergic receptor of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Pharmacology* 31 185-193, in LEWIS ET BERBERICH, 1992.

260 - LEWIS J.A., WU C.H., LEVINE J.H., BERG H.. (1980) Levamisole-resistant mutants of the Nematode *Caenorhabditis elegans* appear to lack pharmacological acetylcholine receptors. *Neuroscience* 5 967-989, in MARTIN *et al.*, 1990.

261 - LIN C.M., HAMEL E.. (1981) Effects of inhibitors of tubulin polymerisation on GTP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 256 9242-9245, in LACEY, 1988.

262 - LING V., THOMPSON L.H.. (1974) Reduced permeability in CHO cells as cells as a mechanism of resistance to colchicine. *Journal of Cell Physiology* 83 103-116, in LACEY, 1988.

263 - LITTAUER U.Z., GIVEON D., THIERAUF M., GINZBURG I., PONSTINGL H.. (1986) Common and distinct tubulin binding sites for microtubule-associated proteins. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 7162-7166, in LACEY, 1988.

264 - LITTLE M., LUDUENA R.F.. (1985) Structural differences between brain  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-tubulins : implication for microtubule assembly and colchicine binding. *EMBO Journal* 4 51-56, in LACEY, 1988.

265 - LO P.K.A., FINK D.W., WILLIAMS J.B., BLODINGER J.. (1985) Pharmacokinetic studies of ivermectin : effects of formulation.

*Veterinary Research Communications* 9 251-268, in CAMPBELL, 1989.

266 - LOCKWOOD A.H.. (1978) The biological regulation of microtubule assembly and function

*In : Cell Reproduction*, Editeurs : DIRKSEN E.R., PRESCOTT D.M., FOX C.F., 271-283. Academic Press, New York, in LACEY, 1988.

267 - LUBEGA G.W., PRICHARD R.K.. (1990) Specific interaction of Benzimidazole anthelmintics with tubulin : high-affinity binding and Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*.

*Molecular and Biochemical Parasitology* 38 221-232.

268 - LUDUENA R.F., ANDERSON W.H., PRASAD V. *et al.*. (1986) Interactions of vinblastine and maytansine with tubulin.

*In : Dynamic Aspects of Microtubule Biology, Annals of New York Academy of Science*. Editeur : SOIFER R.D. 466 718-732, in LACEY, 1988.

269 - LUMNIS C.R., SATTELLE D.B.. (1985) GABA and benzodiazepine binding sites in insect CNS. *Pestic. Sci.* 16 61-65, in CAMPBELL, 1989.

270 - LUSTIGMAN S.. (1993) Molting, enzymes and new targets for chemotherapy of *Onchocerca volvulus*.

*Parasitology Today* 9 (8) 294-297

271 - MACCIONI R.B., SEEDS N.W.. (1982) Involvement of tryptophan residues in colchicine binding and the assembly of tubulin.

*Biochemical and Biophysical Research Communications* 108 896-903, in LACEY, 1988.

272 - MAGENDANTZ M., SOLOMON F.. (1985) Analyzing the components of microtubules : antibodies against chertins, associated proteins from cultured cells.

*Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States* 82 6581-6585, in LACEY, 1988.

- 273 - MAHALANABIS D., JALAN K.N., MAITRA T.K., AGARWAL S.R.. (1976) *Am. J. Clin. Nutr.* **29** 1372-1375, in SANI et VAID, 1988.
- 274 - MAHENDRU W.K., AGARWAL R.A.. (1983) Phorate et mexacardate induced changes in enzyme of the snail *Lymnae acuminata*.  
*Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **12** 77-82, in MOUKRIM, 1987.
- 275 - MAIN A.R.. (1979) Mode of action of anticholinestérase.  
*Pharm. Ther.* **6** 579-628, in MOUKRIM, 1987.
- 276 - MAINGI N., SCOTT M.E., PRICHARD R.K.. (1990) Effect of selection pressure for Thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep.  
*Parasitology* **100** 327-335.
- 277 - MALAN F.S., GRUSS B., ROPER N.A., ASHBURNER A.J., DU PLESSIS C.A.. (1988) Resistance of *Libyostrongylus douglassi* to levamisole in ostriches.  
*Journal of the South African Veterinary Association* **59** 202-203, in VAN WYK, 1990.
- 278 - MALKIN M.F., CAMACHO R.M.. (1972) The effect of Thiabendazole on fumarate reductase from thiabendazole-sensitive and resistant *Haemonchus contortus*.  
*The Journal of Parasitology* **58** (4) 845-846.
- 279 - MARGOLIS R.L., JOB D., PABION M., RAUCH C.T.. (1986) Sliding of stop proteins on microtubule : a model system for diffusion-dependent microtubule motility.  
*In : Dynamic Aspects of Microtubule Biology, Annals of the New York Academy of Sciences*, Editeur SOIFER R.D., New York Academy of Science, New York **466** 306-321, in LACEY, 1988.
- 280 - MARGOLIS R.L., RAUCH C.T.. (1981) Characterisation of rat brain crude extract microtubule assembly : correlation of cold stability with the phosphorylation state of a microtubule-associated 64 K protein.  
*Biochemistry* **20** 4451-4456, in LACEY, 1988.

281 - MARRINER S., ARMOUR J.. (1986). Nematode infections of domestic animals : gastro-intestinal infections.

*In : Chemotherapy of Parasitic Diseases*, Editeurs : CAMPBELL W.C., REW R.S., Plenum Press, New York, 287-305, in LACEY, 1988.

282 - MARTIN P.J.. (1987) Development and control of resistance to anthelmintic.

*International Journal for Parasitology* 17 493-501, in BEUGNET, 1991.

283 - MARTIN P.J.. (1990) Ecological genetics of anthelmintic resistance.

*In* BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

284 - MARTIN P.J., ANDERSON N., BROWN T.H., MILLER D.W.. (1988) Changes in resistance of *Ostertagia* spp. to thiabendazole following natural selection or treatment with levamisole.

*International Journal for Parasitology* 18 333-340, in MARTIN, 1990.

285 - MARTIN P.J., ANDERSON N., JARRETT R.G. *et al.* (1982) Effects of a preventive and suppressive control scheme on the development of thiabendazole-resistance in *Ostertagia* spp.

*Australian Veterinary Journal* 58 185-190, in LACEY, 1988.

286 - MARTIN P.J., MCKENZIE J.A.. (1990) Levamisole resistance in *Trichostrongylus colubriformis* : a sex-linked recessive character.

*International Journal for Parasitology* 20 (7) 867-872.

287 - MARTIN R.J.. (1980) The effect of gamma-aminobutyric acid on the input conductance and membrane potential of *Ascaris* muscle.

*British Journal of Pharmacology* 71 99-106, in MARTIN R.J., 1992.

- 288 - MARTIN R.J.. (1982) Electrophysiological effects of piperazine and diethylcarbamazine on *Ascaris suum* somatic muscle.  
*British Journal of pharmacology* 77 255-265, in MARTIN R.J., 1992.
- 289 - MARTIN R.J.. (1992) Electrophysiological effects of anthelmintics in the parasitic Nematode *Ascaris suum*.  
*Asian Pacific Journal of Pharmacology* 7 231-244.
- 290 - MARTIN R.J., KUSEL J.R. (1992) On the distribution of a fluorescent Ivermectin probe (4"5,7 dimethyl-bodipy propionylivermectin) in *Ascaris* membranes.  
*Parasitology* 104 549-555.
- 291 - MARTIN R.J., PENNINGTON A.J.. (1988) Effect of dihydroavermectin B<sub>1a</sub> on Cl single-channel current in *Ascaris* muscle.  
*Neurotox. '88 Abstr.* 141, in CAMPBELL, 1989.
- 292 - MARTIN R.J., PENNINGTON A.J.. (1989) A patch-clamp study of effects of dihydroavermectin on *Ascaris* muscle.  
*British Journal of Pharmacology* 98 747-756, in MARTIN R.J., 1992.
- 293 - MARTIN R.J., THORN P., GRATION K.A.F., HARROW I.D.. (1992) Voltage-activated currents in somatic muscle of the Nematode parasite *Ascaris suum*.  
*Journal of Experimental Biology* 173 75-90.
- 294 - MATUS A., RIEDERER B.. (1986) Microtubule-associated proteins in the developing brain.  
*In : Dynamic Aspects of Microtubule Biology, Annals of New York Academy of Science.*  
Editeur : SOIFER R.D. 466 167-179, in LACEY, 1988.
- 295 - MAUGEIN P.. (1982) Contribution à l'étude physico-chimique et biologique d'un nouvel anthelminthique : l'albendazole.  
*Thèse de doctorat d'état ès Sciences Pharmaceutiques, Limoges, No. 2, 248 p.*

296 - MAY G.S., GAMBINO J., WEATHERBEE J.A., MORRIS R.N.. (1985) Identification and functional analysis of beta-tubulin genes by site-specific integrative transformation in *Aspergillus nidulans*.

*Journal of Cell Biology* 101 712-719, in KÖHLER, 1990.

297 - Mc CRACKEN R.O., CARR A.W., STILLWELL W.H., LIPKOWITZ K.B., BOISVENUE R., O'DOHERTY G.O.P., WICKISER D.I.. (1993) Trifluoromethanesulfonamide anthelmintics : protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation.

*Biochemical Pharmacology* 45 (9) 1873-1880.

298 - Mc CRACKEN R.O., STILLWELL W.H.. (1991) A possible biochemical mode of action for Benzimidazole anthelmintics.

*International Journal for Parasitology* 21 (1) 99-104.

299 - Mc KELLAR Q.A.. (1988) Strategic use of anthelmintics for parasitic Nematodes in cattle and sheep.

*Vet. Rec.* 123 483-487, in BEUGNET, 1991.

300 - Mc KENNA P.B.. (1990) The detection of anthelmintic resistance by faecal egg count reduction test : An examination of some of the factor affecting performance and interpretation.

*New Zealand Veterinary Journal* 38 142-147.

301 - Mc KENNA P.B., BADGER S.B., Mc KINLEY R.L., TAYLOR D.E.. (1990) Simultaneous resistance to two or more broad-spectrum anthelmintics by gastrointestinal Nematode parasites of sheep an goats.

*New Zealand Veterinary Journal* 38 114-117.

302 - Mc LAREN D.J.. (1976) In : *the Organization of Nematodes*, Editeur CROLL N.A., Academic Press, 139-163, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

- 303 - MEINKE P.T., ROHRER S.P., HAYES E.C., SCHAEFFER J.M., FISHER M.H., MROZIK H.. (1992) Affinity probes for the Avermectin binding proteins.  
*Journal of Medicinal Chemistry* 35 (21) 3879-3884.
- 304 - MELLIN T.N., BUSCH R.D., WANG C.C.. (1983) Postsynaptic inhibition of invertebrate neuromuscular transmission by avermectin B<sub>1a</sub>.  
*Neuropharmacologia* 22 89-96, in CAMPBELL, 1989.
- 305 - MIDDELBERG A., Mc KENNA P.B.. (1983) Oxfendazole resistance in *Nematodirus spathiger*.  
*New Zealand Veterinary Journal* 31 65-66.
- 306 - MILLER T.W., CHAIET L., COLE D.J., FLOR J.E., GOEGELMAN R.T., GULLO V.P., JOSHUA H., KEMPF A.J., KRELLWITZ W.R., MONAGHAN R.L., ORDMOND R.E., WILSON K.E., ALBERS-SCHONBERG G., PUTTER I.. (1979) Avermectins, a new family of potent anthelmintic agents : isolation and chromatographic properties.  
*Antimicrobials Agents Chemotherapy* 15 368-371, in CAMPBELL, 1989.
- 307 - MITCHELL G.B.B., JACKSON F., COOP R.L.. (1991) Anthelmintic resistance in Scotland.  
*The Veterinary Record* 28 58.
- 308 - MOREJOHN L.C., FOSKET D.E.. (1982) Higher plant tubulin identified by self-assembly into microtubules *in vitro*.  
*Nature* 297 426-428, in LACEY, 1988.
- 309 - MOUKRIM A.. (1987) Action des pesticides organophosphorés sur le Mollusque *Lymnaea peregra* Müller. Etudes biochimiques, histologiques et histochimiques.  
*Thèse de doctorat d'Université, mention Sciences naturelles. N° 25, 133 p.*

310 - MOULIA C.. (1992) Modalités des interactions génétiques dans les système hôte-parasite : l'association Nématodes (*Oxyures*) / Murides (*Mus*) en zone d'hybridation hôte. *Thèse de doctorat d'état ès Parasitologie*, Montpellier, 138 p.

311 - MROZIK H.. (1985) *Chemistry and Biological activities of Avermectin Derivatives in Biotechnology and its Application to Agriculture*. Editeur : COPPING L., *British Crop Protection Council (BCPC)*, Monograph No. 32, 133-143, in CAMPBELL, 1989.

312 - MROZIK H., ESKOLA P., ARISON B.H., ALBERS-SCHONBERG G., FISHER M.H.. (1982) Avermectines aglycones. *Journal of Organic Chemistry* 47 489-492, in CAMPBELL, 1989.

313 - MULDER J.G., BAKKER J.. (1988) *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Genet.* 53 (2b) 911-918, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

314 - NATH J.P., EAGLE G.R., HIMES R.H.. (1986) Studies on the exchangeable nucleotide binding site of tubulin. *In : Dynamic Aspects of Microtubule Biology. Annals of the New York Academy of Sciences*, Editeur SOIFER D., New York Academy of Sciences, New York, 466 482-495, in LACEY, 1988.

315 - NATOFF I.L.. (1969) *British Journal of Pharmacology* 37 251-257, in HARROW et GRATION, 1985.

316 - NICHOLSON R., ROBINSON P.S., PALMER P.J., CASIDA J.E.. (1988) Ivermectin-stimulated release of neurotransmitter in the insect central nervous system : modulation by external chloride and inhibition by a novel trioxabicyclooctane and two polychlorocycloalkane insecticides. *Neurotox. '88 Abstr.* #96, in CAMPBELL, 1989.

- 317 - NORTON S., BEER E.J.. (1957) Investigations on the action of piperzine on *Ascaris lumbricoides*.  
*American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 6 898-905, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 318 - NOVAK J., VANEK Z.. (1992) Screening for a new generation of anthelmintic compounds. *In vitro* selection of the Nematode *Caenorhabditis elegans* for Ivermectine resistance.  
*Folia Microbiologica* 37 (3) 237-238.
- 319 - OAKLEY B.R., MORRIS N.R.. (1981) A  $\beta$ -tubuline mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly.  
*Cell* 24 837-845, in LACEY, 1988.
- 320 - OBENDORF D.L., PARSONS J., NICHOLLS J.. (1986) An egg development test for evaluation of benzimidazole resistance in *Nematodirus spathiger*.  
*Australian Veterinary journal* 63 382-383, in LACEY, 1988.
- 321 - O'BRIEN J.J.. (1970) Toxicological aspects of some modern anthelmintics.  
*Australian Veterinary Journal* 46 297-300, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 322 - OELKERS H.A.. (1959) Die chemotherapie der wurmkrankheiten. In : JUCKER E., *Progress in drug research* 1 159-242, Birkhäuser, Basel, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 323 - OGILVIE B.M. *et al.*. (1973) *International Journal for Parasitology* 3 589-597, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 324 - OLMSTED J.B., ASNES C.F., PARYSEK L.M., LYON H.D., KIDDER G.M.. (1986) Distribution of MAP<sub>4</sub> in cells and in adult and developing mouse tissues.  
In : *Dynamic Aspects of Microtubule Biology, Annals of the New York Academy of Sciences*, Editeur SOIFER R.D., New York Academy of Science, New York 466 292-305, in LACEY, 1988.

- 325 - OLSEN R.W., SNOWMAN A.M.. (1985) Avermectin B<sub>1a</sub> modulation of gamma-aminobutyric acid-benzodiazepine receptor binding in mammalian brain.  
*Journal of Neurochemistry* 44 1074-1082, in CAMPBELL, 1989.
- 326 - ONISHI J.C., MILLER T.W.. (1985) The lack of antifungal activity by avermectin B<sub>1a</sub>.  
*J. Antibiot.* 38 1568-1572, in CAMPBELL, 1989.
- 327 - OPPERMAN C.H., CHANG S.. (1990) *Journal of Nematology* 22 481-488, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.
- 328 - OPPERMAN C.H., CHANG S.. (1992) Nematode Acetylcholinesterases : molecular forms and their potential role in Nematode behavior.  
*Parasitology Today* 8 (12) 406-411.
- 329 - OSTEUX R., GUERRIN F., LESIEUR-DEMARQUILLY I.. (1971) Mode d'action de la pipérazine sur *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. II. Etude des contractions musculaires de l'*Ascaris* en présence de pipérazine, de coenzyme A et de l'adénosine-triphosphate.  
*Ann. Pharm. Fr.* 29 173-178, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 330 - PANKAVICH J.A., BERGER H., SIMKINS K.L.. (1992) *Veterinary Record* 130 241-243, in SHOOP, 1993.
- 331 - PARTOSOEDJONO S., DRUDGE J.H., LYONS E.T., KNAPP F.W.. (1969) Evaluation of naphthalophos against *Oestrus ovis* and a thiabendazole-tolerant strain of *Haemonchus contortus* in lamb.  
*American Journal of Veterinary Research* 30 81-83, in ROLFE, 1990.
- 332 - PAUL S.M., SKOLNICK P., ZATZ M.. (1980) Avermectin B<sub>1a</sub> : an irreversible activator of the gamma-aminobutyric acid-benzodiazepine-chloride-ionophore receptor complex.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* 96 632-638, in CAMPBELL, 1989.

333 - PENNINGROTH S.M., KIRSCHNER M.W.. (1977) Nucleotide binding and phosphorylation in microtubule assembly *in vitro*.

*Journal of Molecular Biology* 115 643-673, in LACEY, 1988.

334 - PENNINGROTH S.M., KIRSCHNER M.W.. (1978) Nucleotide specificity in microtubule assembly *in vitro*.

*Biochemistry* 17 734-740, in LACEY, 1988.

335 - PENNINGTON A.J., MARTIN R.J.. (1990) A patch-clamp study of acetylcholine activated ion channels in *Ascaris suum* muscle.

*Journal of Experimental Biology* 154 201-221, in MARTIN R.J., 1992.

336 - PERTEL R., PARAN N., MATTERN C.F.T.. (1976) *Experimental Parasitology* 39 401-414, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

337 - PHILPOT F.. (1924) Notes on the eggs and early development of some species of *Oxyuridae*.

*Journal of Helminthologie* 2 (5) 239-252. in MOULIA, 1992.

338 - PINNOCK R.D., SATTELLE D.B., GRATION K.A.F., HARROW I.D.. (1988) Actions of potent cholinergic anthelmintics (Morantel, Pyrantel and Levamisole) on an identified insect neurone reveal pharmacological differences between Nematode and insect Acetylcholine receptors.

*Neuropharmacology* 27 (8) 843-848.

339 - POMROY W.E. *et al.*. (1992) *New Zealand Veterinary Journal* 40 76-78, in SHOOP, 1993.

340 - PONG S.S., WANG C.C.. (1982) Avermectin B<sub>1a</sub> modulation of gamma-aminobutyric acid receptors in rat brain membranes.

*Journal of Neurochemistry* 38 375-379, in CAMPBELL, 1989.

341 - PONG S.S., WANG C.C., FRITZ L.C.. (1980) Studies on the mechanism of action of avermectin B<sub>1a</sub> : stimulation of release of gamma-aminobutyric acid from brain synaptosomes.

*Journal of Neurochemistry* 34 351-358, in CAMPBELL, 1989.

342 - PONSTINGL H., KRAUHS E., LITTLE M., KEMPF T., HOFER-WARBINEK R., ADE W.. (1982) Amino-acid sequence of alpha and beta-tubuline from pig brain : heterogenicity and regional similarity to muscle proteins.

*Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology* 46 191-198, in LACEY, 1988.

343 - PRASAD A.R.S., LUDUENA R.F., HOROWITZ P.M.. (1986) Detection of energy transfer between tryptophan residues in the tubulin molecule and bound bis(8-anilino-naphthalene-1-sulphonate), an inhibitor of microtubule assembly that bind to flexible region of tubulin.

*Biochemistry* 25 3536-3540, in LACEY, 1988.

344 - PREE D.J., TOWNSHEND J.L., ARCHIBALD D.E.. (1987) *Journal of Nematology* 9 188-193, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

345 - PRICHARD R.K.. (1970) Mode of action of the anthelmintic Thiabendazole.

*Nature* 228 684, in Beugnet, 1991.

346 - PRICHARD R.K.. (1973) The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics.

*International Journal for Parasitology* 3 409-417.

347 - PRICHARD R.K.. (1983) *Mechanisms of drug resistance.*

In XXII<sup>ème</sup> Congrès Mondial Vétérinaire, Editeur : DANIELS, Perth, Australia, 48 p., in BEUGNET, 1991.

- 348 - PRICHARD R.K.. (1990) Anthelmintic resistance in Nematodes : extent, recent understanding and future directions for control and research.  
*International Journal for Parasitology* 20 (4) 515-523.
- 349 - PRICHARD R.K.. (1990) Biochemistry of anthelmintic resistance.  
In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.
- 350 - PRICHARD R.K., HALL C.A., KELLY J.D., MARTIN I.C.A., DONALD A.D.. (1980) The problem of anthelmintic resistance in Nematodes.  
*Australian Veterinary Journal* 56 239-251.
- 351 - PRINCE M.J.R.. (1950) Studies on the life cycle of *Syphacia obvelata*, a common Nematode of rats.  
*Science* 111 66-67, in MOULIA, 1992.
- 352 - QUINN F.R., BEISLER J.A.. (1981) Quantitative structure-activity relationships of colchicines against P388 leukemia in mice.  
*Journal of Medicinal Chemistry* 24 251-256, in LACEY, 1988.
- 353 - RAEYMAEKERS A.H.M., ROEVENS L.F.P., JANSSEN P.A.J.. (1967) The absolute configuration of the optical isomers of the broad spectrum anthelmintic tetramisole.  
*Tetrahedron Lett* 1467-1470, in ARUNDEL *et al.*, 1967.
- 354 - RAHMAN M.S., CORNISH R.A., CHEVIS R.A.F., BRYANT C.. (1977) Metabolic changes in some helminths from sheep treated with mebendazole.  
*New Zealand Veterinary Journal* 25 79-83, in LACEY, 1988.
- 355 - RAPSON E.B., LEE D.L., WATTS S.D.M.. (1981) Changes in the Acetylcholinesterase activity of the Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* following treatment with Benzimidazoles *in vivo*.

*Molecular and Biochemical Parasitology* 4 9-15.

356 - RAPSON E.B. *et al.*. (1986) Acetylcholinesterase secretion, a parameter for the interpretation of *in vitro* anthelmintic screens.

*The Journal of Parasitology* 92 425-430, in BEUGNET, 1991.

357 - RAY K., BHATTACHARYYA B., BISWAS B.B.. (1981) Role of B-ring of colchicine in its binding to tubulin.

*Journal of Biological Chemistry* 256 6241-6244, in LACEY, 1988.

358 - REW R.S., SMITH C., COLGLAZIER M.L.. (1982) Glucose metabolism of *Haemonchus contortus* adults, effects of thiabendazole on susceptible versus resistant strain.

*Journal of Parasitology* 68 845-850, in BEUGNET, 1991.

359 - REW R.S., URBAN J.F., DOUVRES F.W.. (1986) Screen for anthelmintics using larvae of *Ascaris suum*.

*American journal of Veterinary Research* 47 869-873, in LACEY, 1988.

360 - ROACH M.C., BANE S., LUDUENA R.F.. (1985) The effect of colchicine analogues on the reaction of tubulin with iodo [<sup>14</sup>C] acetamide and N,N'-ethylenebis (iodoacetamide).

*Journal of Biological Chemistry* 260 3015-3023, in LACEY, 1988.

361 - ROACH M.C., LUDUENA R.F.. (1984) Different effects of tubulin ligands on the intrachain cross-linking of  $\beta_1$ -tubulin

*Journal of Biological Chemistry* 259 12063-12071, in LACEY, 1988.

362 - ROBERTSON S.J., MARTIN R.J.. (1991) Levamisole-activated single channel currents from muscle of the Nematode parasite *Ascaris suum*.

*British Journal for Pharmacology* 108 170-178.

363 - ROHDE R.A.. (1960) *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 27 121-123, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

364 - ROHRER S.P., MEINKE P.T., HAYES E.C., MROZIK H., SCHAEFFER J.M.. (1992) PHotoaffinity labeling of Avermectin binding sites from *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 4168-4172.

365 - ROLFE P.F. Resistance of *Haemonchus contortus* to broad and narrow spectrum anthelmintics.

In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

366 - ROOS M.H.. (1990) The molecular nature of Benzimidazole resistance in Helminths. *Parasitology Today* **6** (4) 125-127.

367 - ROOS M.H., BOERSEMA J.H.. (1990) Comparison of 4 Benzimidazole susceptible and 9 resistant *Haemonchus contortus* populations by restriction fragment length polymorphism.

In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

368 - RÖSNER M., CAPRANO H.G., JACOBSON A.E., *et al.* (1981) Biological effects of modified colchicines. Improved preparation of 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine and (+)-colchicine and reassignment of the position of the double bond in dehydro-7-deacetamidocolchicines.

*Journal of Medicinal Chemistry* **24** 257-261, in LACEY, 1988.

369 - ROUSH R.T., HOY M.A.. (1981) Genetic improvement of *Metaseiulus occidentalis* : selection with methomyl, dimethoate and carbaryl and genetic analysis of carbaryl resistance. *Journal of Economic Entomology* **74** 138-141, in MARTIN, 1990.

370 - ROUSSET B., WOLFF J.. (1980) Purification of brain tubulin by affinity chromatography on immobilized mactoperoxidase.

*Journal of Biological Chemistry* 255 11677-11681, in LACEY, 1988.

371 - ROZHOKOVA E.K., MALYUTINA T.A., SHISHOV B.A.. (1980) A. Gen. Pharmacol. 11 141-146, in HARROW et GRATION, 1985.

372 - RUSSEL G.J., LACEY E.. (1992) Differential stability of the Benzimidazole (BZ)-tubulin complex in BZ-resistant and BZ-susceptible isolates of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*.

*International Journal for Parasitology* 22 (3) 399-402.

373 - SACKETT D.L., WOLFF J.. (1986) Proteolysis of tubulin and the substructure of the tubulin dimer.

*Journal of Biological Chemistry* 261 9070-9076, in LACEY, 1988.

374 - SANDER J., LABAR J., LADENSTEIN M., SCHWEINSBERG F.. (1975) Quantitative measurement of *in vivo* nitrosamidne formation.

*IARC Sci. Publ.* 9 123-131, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

375 - SANGSTER N.C.. (1990) Biochemical diagnosis of anthelmintic resistance.

In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Rōund Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

376 - SANGSTER N.C., PRICHARD R.K.. (1985) The contribution of a partial tricarboxylic acid cycle to volatile end-products in Thiabendazole-resistant and susceptible *Trichostrongylus colubriformis*.

*Molecular and Biochemical Parasitology* 14 261-274.

- 377 - SANGSTER N.C., PRICHARD R.K. (1986) Thiabendazole uptake, metabolism and excretion in Thiabendazole resistant and susceptible *Trichostrongylus colubriformis*.  
*The Journal of Parasitology* 72 (5) 798-800.
- 378 - SANGSTER N.C., PRICHARD R.K., LACEY E.. (1985) Tubulin and Benzimidazole-resistance in *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda).  
*The Journal of Parasitology* 71 (5) 645-651.
- 379 - SANGSTER N.C., RILEY F.L., COLLINS G.H.. (1988) Investigation of the mechanism of Levamisole resistance in Trichostrongylid Nematodes of sheep.  
*International Journal for Parasitology* 18 (6) 813-818.
- 380 - SANGSTER N.C., WHITLOCK H.V., RUSS J.R., GUNAWAN M., GRIFFIN D.L., KELLY J.D.. (1979) *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole : occurrence in a field strain.  
*Research in Veterinary Science* 27 106-110, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 381 - SANI B.P., VAID A.. (1988) Specific interaction of Ivermectin with Retinol-binding protein from filarial parasites.  
*Biochemistry Journal* 249 929-932.
- 382 - SASI P.K., RAJ R.K.. (1975) Effect of piperazine on the level of phospholipid and on the activities of certain enzymes of phospholipid metabolism in human *Ascaris lumbricoides*.  
*Experientia* 31 1261-1262, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 383 - SAVIN Y.I., SINGIN A.S., KOROLEV J.K.. (1977) Synthesis of <sup>14</sup>C-piperzine and feature of its distribution in animals.  
*Khim. Farm. Zh.* 11 26-30, in ARUNDEL *et al.*, 1983.
- 384 - SCHAEFFER J.M., HAINES H.W.. (1989) *Biochemical Pharmacology* 38 2329-2338, in ROHRER *et al.*, 1992.

385 - SCHORDERET M.. (1989) Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques.

*Editions Frison-Roche et Slatkine*, 1988, 918 p.

386 - SCOTT E.W., AMOUR J.. (1991) *Veterinary Record* 128 346-349, in SHOOP, 1993.

387 - SERRANO L., AVILA J., MACCIONI R.B.. (1984) Limited proteolysis of tubulin and localization of the binding site for colchicine.

*Journal of Biological Chemistry* 259 6607-6611, in LACEY, 1988.

388 - SERRANO L., VALENCIA A., CABALLERO R., AVILA J.. (1986) Localization of the high affinity calcium-binding site on tubulin molecule.

*Journal of Biological Chemistry* 261 7076-7081, in LACEY, 1988.

389 - SHELANSKI M.L., GASKIN F., CANTOR C.R.. (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotides.

*Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 763-768, in LACEY, 1988.

390 - SHERLINE P., BODWIN C.K., KIPNIS D.M.. (1974) A new colchicine binding assay for tubulin.

*Analytical Biochemistry* 62 400-407, in LACEY, 1988.

391 - SHERLINE P., SCHIAVONE K., BROCATO S.. (1979) Endogenous inhibitor of colchicine-tubulin binding in rat brain.

*Science* 205 593-595, in LACEY, 1988.

392 - SHIAU G.T., DE T.T., HARMON R.E.. (1976) Alkylthio-colchicines and N-deacetyl-alkylthiocolchicines and their antileukemic activity.

*Journal of Pharmaceutical Sciences* 64 646-648, in LACEY, 1988.

393 - SHOOP W.L.. (1992) *Veterinary Record* 131 375, in SHOOP, 1993.

394 - SHOOP W.L.. (1993) Ivermectin resistance.

*Parasitology Today* 9 (5) 154-159.

395 - SHOOP W.L., EGERTON J.R., EARY C.H., SUHAYDA D.. (1990) Laboratory selection of Benzimidazole-resistant isolate of *Trichostrongylus colubriformis* for Ivermectin resistance.

*The Journal of Parasitology* 76 (2) 186-189.

396 - SIGEL E., BAUR R.. (1987) Effect of avermectin B<sub>1a</sub> on chick neuronal gamma-aminobutyric acid receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes.

*Molec. Pharm.* 32 749-752, in CAMPBELL, 1989.

397 - SMEAL M.G., GOUTH P.A., JACKSON A.R., HOTSON I.K.. (1968) The occurrence of strains of *Haemonchus contortus* resistant to thiabendazole.

*Australian Veterinary Journal* 44 108-109.

398 - SMITH G.. (1990) A mathematical model for the evolution of anthelmintic resistance in a direct life cycle Nematode parasite.

*International Journal for Parasitology* 20 (7) 913-921.

399 - SODERLUNG D.M., ADAMS P.M., BLOOMQUIST J.R.. (1987) Differences in the action of avermectin B<sub>1a</sub> on the GABA<sub>A</sub> receptor complex of mouse and rat.

*Biochemical and Biophysical Research Communications* 146 692-698, in CAMPBELL, 1989.

400 - SPURR H.W.. (1985) In : *An advanced Treatise on Meloidogyne (Vol.1) : Biology and Control*, Editeurs : SASSER J.N., CARTER C.C., North Carolina State University Graphics, 269-277, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

401 - STEARNS T., BOTSEIN D.. (1988) Unlinked non-complementation : isolation of new conditional-lethal mutations in each of the genes of *Saccharomyces cerevisiae*.

*Genetics* 119 249-260, in KÖHLER, 1990.

402 - STERNLICHT H., YAFFE M.B., FARR G.W.. (1987) A model of nucleotide-binding site in tubulin.

*FEBS Letters* 214 226-235, in LACEY, 1988.

403 - STURCHLER D., HOLZER B., HAUCK A., OEGREMONT A.. (1983) *Acta Trop.* 40 261-269, in SANI et VAID, 1988.

404 - STYLES J.A., GARNER R.. (1974) Benzimidazolcarbamatemethyl ester-evaluation of its effects *in vivo* and *in vitro*.

*Mutation Research* 26 177-187, in LACEY, 1988.

405 - SUTHERLAND I.H., CAMPBELL W.C.. (1990) Development, pharmacokinetics and mode of action of Ivermectin.

*Acta Leidensia* 1/2 161-168.

406 - SUTHERLAND I.H., LEE D.L.. (1989) Colorimetric assay for the detection of benzimidazole resistance in Trichostrongylides.

*Research in Veterinary Science* 46 363-366, in BEUGNET, 1991.

407 - SUTHERLAND I.H., LEE D.L., LEWIS D.. (1988) Detection of Benzimidazole resistance in Trichostrongylid Nematodes.

*Parasitology Today* 4 (1) 22-24.

408 - SYMOENS J., DE CREE J., VAN BEVER W.F.M., JANSSEN P.A.J.. (1979) Levamisole In : GOLDBERG M.E. *Pharmacological and Biochemical properties of drug substances*, American Pharmaceutical Association Academy of Pharmaceutical Sciences, Washington DC, 2 407-464, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

409 - TAKAHASHI M., IWASAKI S., KOBAYASHI H., OKUDA S., MURAI T., SATO Y.. (1987) Rhizoxin binding to tubulin at the maytansine binding site.

*Biochimica et Biophysica Acta* 926 215-223, in LACEY, 1988.

410 - TANAKA K., MATSUMURA F.. (1985) Action of avermectin B<sub>1a</sub> on the leg muscles and nervous system of the american cockroach.

*Pest. Biochem. Physiol.* 24 124-135, in CAMPBELL, 1989.

411 - TAYLOR M.A.. Anthelmintic resistance in Nematodes in the UK and Ireland.

In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

412 - TAYLOR M.A., HUNT K.R.. (1989) Anthelmintic drug resistance in the UK.

*The Veterinary Record* 12 143-147.

413 - TAYLOR M.A., HUNT K.R., WILSON C.A., BAGGOTT D.G.. (1990) Efficacy of Ivermectin against Benzimidazole-resistant Nematodes of sheep.

*The Veterinary Record* 22 302-303.

414 - THOMAS H., GÖNNERT R., POHLKE R., SEUBERT J.. (1975) *Proc. 7<sup>th</sup> Int. Conf. Wld. Assoc. Adv. Vet. Parasit.*, Thessaloniki, Abstr. No. 50., in ANDREWS ET THOMAS, 1983.

415 - THOMPSON D.P., HO N.F.H., SIMS S.M., GEARY T.G.. (1993) Mechanistic approaches to quantitate anthelmintic absorption by gastrointestinal Nematodes.

*Parasitology Today* 9 (1) 31-35.

416 - TOWNSEND L.B., WISE D.S.. (1990) The synthesis and chemistry of certain anthelmintic Benzimidazoles.

*Parasitology Today* 6 (4) 107-112.

417 - VALLEE R.B., BLOOM G.S., LUCA F.C.. (1986) Differential structure and distribution of the high molecular weight/brain microtubule associated proteins MAP<sub>1</sub> and MAP<sub>2</sub>.

*In : Dynamic Aspects of Microtubule Biology. Annals of the New York Academy of Sciences.* The New York Academy of Sciences, New York, Editeur : SOIFER R.B., 466 134-144, in LACEY, 1988.

418 - VAN BELLE H., JANSSEN P.A.J.. (1979) Alpha-ketoaldehydes, specific catalysts for thiol formation from levamisole.

*Biochemical Pharmacology* 28 1313-1318, in ARUNDEL *et al.*, 1967.

419 - VAN DEN BOSSCHE H.. (1972) Biochemical effects of the anthelmintic drug mebendazole. *In : Comparative Biochemistry of Parasites*, Editeur : VAN DEN BOSSCHE H., Academic Press, New York, 139-157, in BENNET et BRYANT, 1984.

420 - VAN DEN BOSSCHE H.. (1976) effects of levamisole and tetramisole on the acetylcholinesterase activity. *JANSSEN Research Products Information Service*. Serial number : R 8299/4, R 12564/3, Beerse, in ARUNDEL *et al.*, 1967.

421 - VAN DEN BOSSCHE H., ROCHETTE F., HORIG C.. (1982) Mebendazole and related anthelmintics.

*Advances in Pharmacology and Chemotherapy* 19 67-128, in LACEY, 1988.

422 - VAN DEN BOSSCHE H., THIENPONT D., JANSSEN P.G. (Eds) (1985) Chemotherapy of Gastro-intestinal helminths, Springer, Berlin,, in LACEY, 1988.

423 - VAN NUETEN J.M.. (1972) Pharmacological aspects of tetramisole. *In : VAN DEN BOSSCHE H. Comparative Biochemistry of Parasites*, Academic Press, New York, 101-115, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

424 - VAN WYK J.A.. (1990) Occurrence and dissemination of anthelmintic resistance in South Africa, and management of resistant worm strains.

In BORRAY J.C., MARTIN P.J., ROUSH R.T.. (1990) Resistance of parasites to antiparasitic drugs. *Round Table Conference, VII<sup>Th</sup> International Congress of Parasitology, Paris (France)*. 219 p.

425 - VAN WYK J.A., BATH G.F., GERBER H.M., ALVES R.M.R.. (1990) A field strain of *Trichostrongylus colubriformis* resistant to Levamisole and Morantel in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 57 119-122.

426 - VAN WYK J.A., GERBER H.M.. (1980) A field strain of *Haemonchus contortus* Showing slight resistance to rafoxanide.

*Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 47 137-142, in ROLFE, 1990.

427 - VAN WYK J.A., GERBER H.M., ALVES R.M.. (1982) Slight resistance to the residual effect of closantel in a field strain of *Haemonchus contortus* which showed increased resistance after one selection in the laboratory.

*Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 49 257-261, in ROLFE, 1990.

428 - VAN WYK J.A., MALAN F.S., GERBER H.M., ALVES R.M.. (1987) Two field strains of *Haemonchus contortus* resistant to rafoxanide.

*Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 54 143-146, in ROLFE, 1990.

429 - VAN WYK J.A., MALAN F.S.. (1988) Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and benzimidazoles in sheep in South Africa. *Veterinary Record* 123 226-228, in ROLFE, 1990.

430 - VAN WYK J.A., MALAN F.S., GERBER H.M., ALVES R.M.. (1989) Problems of escalating resistance of *Haemonchus contortus* to modern anthelmintics in South Africa.

*Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 56 41-49, in ROLFE, 1990.

431 - VAN WYK J.A., VAN SCHALKWYK P.C.. (1990) A novel approach to the control

of anthelmintic resistant *Haemonchus contortus* in sheep.

*Veterinary parasitology* 35 61-69, in MARTIN, 1990.

432 - VERHOEVEN H.L.E., WILLEMSSENS G., VAN DEN BOSSCHE H.. (1976) Uptake and distribution of levamisole in *Ascaris suum*.

*Biochemistry of parasites and host-parasite relationships*. In VAN DEN BOSSCHE H. : Editeur, 573-579, in ARUNDEL *et al.*, 1983.

433 - VERHOEVEN H.L.E., WILLEMSSENS G., VAN DEN BOSSCHE H.. (1980)

*Biochemistry of parasites and host-parasite relationships*. In VAN DEN BOSSCHE H. : Editeur, 573-579, in THOMPSON *et al.*, 1993.

434 - VIEIRA L.S., *et al.*. (1992) *Veterinary Parasitology* 45 111-116, in SHOOP, 1993.

435 - VOSS G., SPEICH J.. (1976) *Experientia* 32 1498-1499, in OPPERMAN ET CHANG, 1992.

436 - VLASSOFF A., KELLE P.R.. (1980) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*.

*New Zealand Veterinary Journal* 28 23-24, in ROLFE, 1990.

437 - WAGLAND B.M., JONES W.O., HRIBAR L., BENDIXSEN T., EMERY L.. (1992)

A new assay for larval migration inhibition.

*International Journal for Parasitology* 22 (8) 1183-1185.

- 438 - WAHID F.N., BEHNKE J.M.. (1992) Stimuli for acquired resistance to *Heligmosomoides polygyrus* from intestinal tissue resident L<sub>3</sub> and L<sub>4</sub> larvae. *International Journal for Parasitology* 22 (6) 699-710.
- 439 - WALLER P.J.. (1986) Anthelmintic resistance in Australia. *Parasitology Today, Australian Supplement, July 1986*, S16-S18.
- 440 - WALLER P.J.. (1989) *Compte-rendu de la première réunion du "groupe de réflexion pour la bonne utilisation des anthelminthiques chez les petits ruminants"*. Organisé par MERCK-AGVET. Orly le 26 septembre 1989, in BEUGNET, 1991.
- 441 - WALLER P.J.. (1990) Resistance in Nematode Parasites of livestock to the Benzimidazole anthelmintics. *Parasitology Today* 6 (4) 127-129.
- 442 - WALLER P.J., DOBSON R.J., DONALD A.D., GRIFFITHS D.A., SMITH E.F.. (1985) Selection studies on anthelmintic resistant and susceptible populations of *Trichostrongylus colubriformis* of sheep. *International Journal for Parasitology* 15 669-676, in MARTIN, 1990.
- 443 - WANG C.C.. (1984) Parasite enzymes as potential targets for antiparasitic chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry* 27 (1) 1-9.
- 444 - WATSON T.G., HOSKING B.C.. (1990) Evidence for multiple anthelmintic resistance in two Nematode parasite genera on a Saanen goat dairy. *New Zealand Veterinary Journal* 38 50-53.
- 445 - WATTS S.D.M.. (1980) The preparation of a fraction with tubulin-like properties from the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Biochemical Society Transactions* 8 71-72, in LACEY, 1988.

446 - WATTS S.D.M., RAPSON E.B., ATKINS A.M., LEE D.L.. (1982) Inhibition of acetylcholinesterase secretion from *Nippostrongylus brasiliensis* by benzimidazole anthelmintics.

*Biochemical Pharmacology* 31 3035-3040, in LACEY, 1988.

447 - WEBB R.F., Mc CULLY C.H., CLARKE F.L., GREENTREE P., HONEY P.. (1979) The incidence of thiabendazole resistance in field populations of *Haemonchus contortus* on the Northern Tablelands of New South Wales.

*Australian Veterinary Journal* 55 422, in ROLFE, 1990.

448 - WESCOTT D.E.. (1987) *International Journal for Parasitology* 17 503-510, in CAMPBELL, 1990.

449 - WILLIAMS M., RISLEY E.A.. (1984) Ivermectin interactions with benzodiazepine receptors in rat cortex and cerebellum *in vitro*.

*Journal of Neurochemistry* 42 745-753, in CAMPBELL, 1989.

450 - WILLIAMS M., YARBROUGH G.G. (1979) Enhancement of *in vitro* binding and some of the pharmacological properties of diazepam by a novel anthelmintic agent, avermectin B<sub>1a</sub>.

*European Journal of Pharmacology* 56 1273-1276, in CAMPBELL, 1989.

451 - WILLIAMS R.F., MUMFORD C.L., WILLIAMS G.A. *et al.* (1985) A photoaffinity derivative of colchicine : 6'-(4'-azido-2'-nitrophenylamino) hexanoyl-deacetylcolchicine.

*Journal of Biological Chemistry* 260 13794-13802, in LACEY, 1988.

452 - WILSON L.. (1970) Properties of colchicine binding protein from chick embryo protein. Interaction with vinca alkaloids and podophyllotoxin.

*Biochemistry* 9 4999-5007, in LACEY, 1988.

453 - WILSON L.. (1975) Microtubules as drug receptors : pharmacological properties of microtubule protein.

*In : Annals of the New York Academy of Sciences*, Editeur SOIFER D., New York Academy of Sciences, New York, 253 212-231, in LACEY, 1988.

454 - WOLFF A., DENOULET P., JEANTET C.. (1982) High level oftubulin microheterogenicity in the mouse brain.

*Neurosciences Letters* 31 323-328, in LACEY, 1988.

455 - YEATES R.A., OGILVIE B.M.. (1976) Nematode acetylcholinesterases.

*In VAN DEN BOSSCHE H., Biochemistry of parasites and host-parasite relationship*, Editor: Janssen Research Foundation, 664 p., in BEUGNET, 1991.

456 - YEH H.J.C., CHRZANOWSKA M., BROSSI A.. (1988) The importance of phenyl-tropolone "aS" configuration in colchicine's binding to tubulin.

*FEBS Letters* 229 82-86, in LACEY, 1988.

457 - ZAVALA F., GUENARD D., POTIER P.. (1978) Interaction of vinblastine analogues with tubulin.

*Experientia* 34 1497-1499, in LACEY, 1988.

458 - ZAVALA F., GUENARD D., ROBIN J.P., BROWN E.. (1980) Structure-antitubulin activity relationships in steganacin congeners and analogues. Inhibition of tubulin polymerization *in vitro* by (±)-isodeoxypodophyllotoxin.

*Journal of Medicinal Chemistry* 3 546, in LACEY, 1988.

459 - ZEEBERG B., CAPLOW M.. (1979) Determination of free and bound microtubular protein and guanine nucleotide under equilibrium conditions.

*Biochemistry* 18 3880-3886, in LACEY, 1988.

460 - ZUFALL F., FRANKE C., HATT H.. (1989) The insecticide avermectin B<sub>1a</sub> activates a chloride channel in crayfish muscle membrane.

*Journal of Experimental Biology* 142 191-205, in ARENA *et al.*, 1992.

461 - ZWEIG M.H., CHIGNELL C.F.. (1973) Interaction of some colchicine analogs, vinblastine and podophyllotoxin with rat brain microtubule protein.

*Biochemical Pharmacology* 22 2141-2150, in LACEY, 1988.

## TABLE DES MATIERES

PLAN .....	1
INTRODUCTION .....	3
LES NEMATODES GASTRO-INTESTINAUX .....	6
CARACTERES BIOLOGIQUES GENERAUX : .....	7
CYCLES DE DEVELOPPEMENT DE QUELQUES NEMATODES GASTRO-	
INTESTINAUX : .....	10
Cycles à un seul hôte, sans stade libre : .....	10
Sans migration : .....	10
Super famille des <i>Oxyuroidea</i> : .....	10
Superfamille des <i>Trichinelloidea</i> : .....	12
Avec migration : .....	13
Superfamille des <i>Ascaridoidea</i> : .....	13
Cycles à un seul hôte, avec stades libres : .....	14
Superfamille des <i>Strongyloidea</i> : .....	14
<i>Ancylostoma duodenale</i> et <i>Necator americanus</i> : .....	14
Les stongles gastro-intestinaux (décrits ici chez les ruminants	
ovins et bovins : .....	15
Superfamille des <i>Rhabditoidea</i> : .....	19
Cycle indirect avec passage dans le milieu extérieur : ..	20
Cycle direct endogène : .....	20
PRINCIPAUX ANTIHELMINTIQUES .....	21
DERIVES NATURELS : .....	22
Les alcaloïdes de l'ipéca : .....	22
Les dérivés du phloroglucinol : .....	23
Les avermectines : .....	23
LES DERIVES DE SYNTHESE : .....	23
Les dérivés de l'antimoine : .....	23
Les dérivés arsénicaux : .....	23

Les composés hétérocycliques : . . . . .	23
La pipérazine et ses dérivés : . . . . .	24
Les dérivés chlorés : . . . . .	24
Les organophosphorés : . . . . .	24
Les ammoniums quaternaires : . . . . .	24
Les dérivés de la pyridine : . . . . .	24
Les tétrahydro-pyrimidines : . . . . .	25
Les dérivés diphényls et diphényls substitués : . . . . .	25
Les benzanilides ou salicylanilides : . . . . .	25
Les cyanines : . . . . .	25
Les dérivés de l'acridine : . . . . .	25
Les thioxanones : . . . . .	26
Les dérivés de l'imidazole et imidazothiazoles : . . . . .	26
Les benzimidazoles : . . . . .	26
Les thiazolyl benzimidazoles : . . . . .	26
Les carbamates de thiazolyl benzimidazoles : . . . . .	26
Les méthyl carbamates de benzimidazoles : . . . . .	26
Les prodrogues : . . . . .	28
Dérivés divers : . . . . .	28
LES PRINCIPAUX MEDICAMENTS ACTIFS CONTRE LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX DES RUMINANTS : . . . . .	29
LA NOTION DE RESISTANCE . . . . .	31
DEFINITION DE LA NOTION DE RESISTANCE AUX ANTIHELMINTHIQUES: . . . . .	32
LES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE: . . . . .	33
LA PSEUDORESISTANCE : . . . . .	33
LES CARACTERISTIQUES DE LA RESISTANCE : . . . . .	35
Etiologie de la résistance : . . . . .	35
Les facteurs liés à l'antihelminthique : . . . . .	35
L'importance de l'antihelminthique et de sa famille chimique: . . . . .	35

La posologie : . . . . .	37
Le rythme de traitement : . . . . .	38
Influence des traitements antihelminthiques sur l'infestation ou la réinfestation par les strongles : . . . . .	38
L'alternance des produits : . . . . .	39
Les facteurs liés au parasite : . . . . .	40
Caractéristiques physiologiques parasitaires : . . . . .	40
Génétique parasitaire et résistance : . . . . .	43
Les bases moléculaires de la résistance : . . . . .	47
Les facteurs de résistances liés aux conditions d'élevage des animaux et au climat : . . . . .	49
Les espèces hôtes concernées : . . . . .	50
La conduite de l'élevage : . . . . .	50
Evolution, persistance et réversion de la résistance, tentatives de modélisation mathématique : . . . . .	51
<b>METHODES DE MISE EN EVIDENCE ET D'ETUDE DE LA RESISTANCE . . . . .</b>	<b>54</b>
<b>LES ESSAIS <i>IN VIVO</i> : . . . . .</b>	<b>56</b>
Le bilan parasitaire : . . . . .	56
Essai par coproscopie : . . . . .	57
<b>LES ESSAIS <i>IN VITRO</i> : . . . . .</b>	<b>59</b>
Essais utilisés en routine : . . . . .	59
Essais de résistance au lévamisole, pyrantel, morantel : . . . . .	59
Test de paralysie des larves infectantes : . . . . .	59
Pouvoir paralysant du lévamisole : . . . . .	59
Tests d'inhibition d'éclosion des oeufs en présence de benzimidazoles : . . . . .	60
La technique : . . . . .	61
Lecture de l'essai et analyse des résultats : . . . . .	63
Conclusion : . . . . .	64
Perspective des essais <i>in vitro</i> : . . . . .	64
Test d'inhibition du développement larvaire : . . . . .	64

Test de résistance des stades parasitaires : . . . . .	65
Les méthodes biochimiques : . . . . .	65
Essais de liaison des benzimidazoles à la tubuline : . . . . .	65
Dosage quantitatif des activités enzymatiques : . . . . .	72
Comparaison des isoenzymes : . . . . .	73
Méthodes génétiques : . . . . .	73
RESISTANCE ET MODE D'ACTION DES ANTIHELMINTHIQUES . . . . .	74
SITES D'ACTION DES ANTIHELMINTHIQUES : . . . . .	75
MODE D'ACTION DES ANTIHELMINTHIQUES ET MECANISMES DES RESISTANCES : . . . . .	77
Composés agissant sur la neurophysiologie des helminthes : . . . . .	77
Les anticholinestérasiques : . . . . .	77
Rappels sur la transmission synaptique et les cholinestérases : . . . . .	79
L'acétylcholinestérase des Nématodes, son rôle dans le mode d'action de certains antihelminthiques : . . . . .	88
Les cholinomimétiques : . . . . .	95
LES TETRAHYDROPYRIMIDINES : . . . . .	95
LES IMIDAZOTHIAZOLES : le lévamisole et le tétramisole : . . . . .	102
Les anticholinergiques : . . . . .	108
LES AVERMECTINES: . . . . .	108
LA PIPERAZINE ET LA DIETHYLCARBAMAZINE : . . . . .	139
Composés découplant la phosphorylation oxydative: . . . . .	141
Composés interférant avec le métabolisme énergétique : . . . . .	142
Le système " <i>succinate décarboxylase</i> " : . . . . .	144
Le système " <i>NADH-fumarate réductase</i> " : . . . . .	144
Résistance et fumarate réductase : . . . . .	148
Composés affectant l'intégrité cellulaire : . . . . .	154
LES BENZIMIDAZOLES : . . . . .	154
Chimie et pharmacocinétique : . . . . .	154

Les benzimidazoles en thérapeutique humaine : . . . . .	161
Les benzimidazoles en thérapeutique vétérinaire: . . . . .	163
Mode d'action des benzimidazoles et résistance: . . . . .	171
LE PRAZIQUANTEL : . . . . .	221
CONCLUSION . . . . .	222
BIBLIOGRAPHIE . . . . .	227
TABLE DES MATIERES . . . . .	288

**MOUVEROUX Eric.** - Mode d'action de quelques anthelminthiques et développement des résistances par certains Nématodes gastro-intestinaux.

Thèse pour le diplôme de Docteur en Pharmacie. Université de LIMOGES 1993.

**RESUME :**

La résistance des Nématodes gastro-intestinaux aux anthelminthiques est maintenant un phénomène mondial touchant particulièrement le monde vétérinaire. Les différents modes d'action des composés anthelminthiques sont à la base de processus de résistance spécifiques à chaque famille chimique. Ces modes d'actions, leur influence sur le développement des résistances et les méthodes de détection et d'étude de celles-ci sont discutés.

**MOTS CLES :**

- Anthelminthiques
- Résistance aux anthelminthiques
- Nématodes gastro-intestinaux
- Mode d'action
- Mécanisme de résistance
- Benzimidazole

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur NICOLAS  
Juge : Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences  
Juge : Monsieur LAMBERT, Maître de Conférences  
Juge : Madame le Professeur PESTRE-ALEXANDRE

**DATE DE SOUTENANCE :**

20 septembre 1993

**ADRESSE DE L'AUTEUR :**

2 Rue du Progrès  
34000 MONTPELLIER.