

Étude de la réversion de la résistance aux médicaments anthelminthiques chez le nématode Caenorhabditis elegans

Amandine Goulon

▶ **To cite this version:**

Amandine Goulon. Étude de la réversion de la résistance aux médicaments anthelminthiques chez le nématode Caenorhabditis elegans. Biotechnologies. 2016. hal-01824829

HAL Id: hal-01824829
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01824829

Submitted on 27 Jun 2018

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

MASTER BioMANE
Biotechnologies Microbiologie Aliment
Nutrition Environnement

BioMANE

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Master BioMANE 2ère année

Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement

Spécialité : *Biotechnologies Microbiennes*

Année Universitaire 2015/2016

Étude de la réversion de la résistance aux médicaments anthelminthiques chez le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Mémoire présenté par :
Amandine GOULON

Encadré par MENEZ Cécile / PH.D., Pharma.D. Unité Transporteurs membranaires et Résistance (TMR).

Stage effectué du 18 janvier au 18 juillet 2016
Laboratoire ToxAlim (INRA)
180 Chemin de Tournefeuille
BP 93173
31027 Toulouse

INRA SCIENCE & IMPACT

ToxAlim RESEARCH CENTER IN FOOD TOXICOLOGY

Titre du stage :

Étude de la réversion de la résistance aux médicaments anthelminthiques chez le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Mr. Bernard SALLES, directeur de l'UMR 1331 Toxicologie Alimentaire (ToxAlim) de m'avoir permis d'effectuer mon stage de Master 2 Biotechnologies Microbiennes au sein du laboratoire de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) à Toulouse.

Je remercie Mme. Anne LESPINE pour m'avoir accueilli dans son équipe et son service Transporteurs Membranaires et Résistance, pour m'avoir offert cette opportunité de stage et pour son aide dans la réalisation du rapport de stage.

Je remercie tout particulièrement Mme. Cécile MENEZ-BERLIOZ, maître de stage, pour le partage de son expérience et de ses connaissances, pour sa patience et sa pédagogie, ainsi que pour son intérêt et son aide dans la rédaction de mon rapport.

Je remercie également :

Mélanie ALBERICH pour m'avoir formé sur le modèle d'étude *C. elegans*, pour ses conseils et pour le temps qu'elle m'a accordé malgré ses nombreuses occupations. Elise COURTOT pour sa bonne humeur permanente et communicative, Léa LASVAUX pour sa gentillesse à chaque instant. Marion DAVID, Chantal LEBRUN et Jean-François SUTRA pour leur soutien tout au long du stage. Je vous remercie pour votre accueil, vous avez été des collègues de travail formidables.

Sommaire

Liste des abréviations 7
I. INTRODUCTION 9
1. Présentation de l'entreprise. 9
2. Synthèse bibliographique. 10
2.1. La chimiothérapie antiparasitaire. 10
2.1.1. Les différentes classes de médicaments anthelminthiques. 10
2.1.2. Les lactones macrocycliques. 11
2.2. Emergence de résistances aux LMs. 14
2.2.1. Défintion de la résistance. 14
2.2.2. Cas de résistance aux LMs. 14
2.3. Mécanismes de résistance aux LMs chez les nématodes. 15
2.3.1. Modification de structures neuronales. 15
2.3.2. La résistance croisée. 15
2.4. Le modèle *Caernohabditis elegans*. 16
2.4.1. Utilisation en laboratoire. 16
2.4.2. Anatomie et cycle de développement. 17
2.5 « Fitness » et réversion de la résistance 17
1.4. Objectifs du stage. 18
II. MATERIELS ET METHODES 19
1. Matériels. 19
2. Souches de *C. elegans* utilisées pour l'étude. 19
3. Maintien des souches et synchronisation de population. 20
4. Test de développement larvaire (Larval Development Assay, LDA). 20
5. Dye filling assay (test de coloration des neurones des amphides) 21
6. Test de chimiotactisme. 21
7. Tolérance au stress oxydatif. 22
8. Tolérance au stress osmotique. 22
9. Tolérance au stress thermique. 23
10. Test de longévité en milieu liquide. 23
11. Analyses statistiques. 23
12. Récapitulatifs chronologiques des tests effectués. 24
III. RESULTATS 25
1. Réversion de la résistance aux LMs chez *C. elegans*. 25

2. Intégrité des structures neuronales des amphides. 27
3. Etude du chimiotactisme vis-à-vis de la nourriture chez *C. elegans*. 29
4. Evaluation de la tolérance au stress oxydatif chez *C. elegans*. 31
5. Evaluation de la tolérance au stress salin chez *C. elegans*. 32
6. Evaluation de la tolérance au stress thermique chez *C. elegans* 33
7. Evaluation de la longévité chez *C. elegans*. 34
IV. DISCUSSION 37
BIBLIOGRAPHIE 41
ANNEXES A 45
CONVENTION 46
RÉSUMÉ 50

Liste des abréviations

Acide gamma-aminobutyrique : GABA

Caenorhabditis elegans : C. elegans

Canaux chlorures glutamates dépendants : GluCl

Cooperia oncophora : C.oncophora

Diméthyl sulfoxide : DMSO

Haemonchus contortus : H.contortus

Institut National pour la Recherche Agronomique : INRA

Ivermectine : IVM

Souche N2B résistante à 10 ng/mL d'Ivermectine : IVR10

Lactones macrocycliques : LMs

Nematode Growth Medium : NGM

Moxidectine : MOX

Souche N2B résistante à 3,8 ng/mL de Moxidectine : MOX4R

Multi Drug Resistance associated Proteins : MRP

Organisation mondiale de la santé : OMS

P-glycoprotéine : P-gp

Pression de sélection : PS

Transporteurs ATP Binding cassette : Transporteurs ABC

Transporteurs Membranaires et Résistance : TMR

Unité mixte de recherche : UMR

I. INTRODUCTION

1. Présentation de l'entreprise.

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) est un organisme public de recherche en agronomie en France. L'institut voit le jour en 1946 et est actuellement présidé par François Houllier sous la tutelle du ministère chargé de la Recherche et de l'Enseignement supérieur et du ministère chargé de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. L'INRA est le premier institut de recherche agronomique en Europe et se place en seconde place au niveau mondial pour les sciences agricoles. Avec un budget de 880 millions d'euros, l'INRA embauche 8290 agents titulaires dont 1840 chercheurs titulaires.

L'organisme cible trois grands domaines d'activités : l'agriculture, l'alimentation et l'environnement. Ses missions concernent la production et la diffusion des connaissances scientifiques au travers de 4000 publications par an ; la formation à la recherche et par la recherche ; la contribution à l'innovation avec 360 brevets, 27 nouveaux logiciels et de nouvelles bases de données ; l'élaboration de stratégie de recherche nationale et européenne ; la contribution au dialogue entre science et société et enfin éclairer les décisions publiques. L'INRA s'engage dans le développement durable par une gestion des laboratoires et une sensibilisation du personnel, mais aussi dans l'évaluation de ses instituts et personnels, et dans la qualité au sein des unités de recherche.

L'INRA dispose de 186 unités de recherche avec 13 départements de recherche et s'implante sur 17 centres de recherche en France. Le centre Toulouse Midi-Pyrénées emploi 850 chercheurs, ingénieurs et techniciens et représente 10% des publications de l'INRA.

Le laboratoire ToxAlim, présidé par Bernard Salles (figure 1), est une unité mixte de recherche (UMR 1331) du centre INRA de Toulouse. L'unité contribue à l'élaboration de connaissances sur les effets toxicologiques à long terme aussi bien au niveau de la santé huamine qu'en santé vétérinaire. Elle se compose de 11 équipes de recherches couvrant des domaines scientifiques larges. L'équipe E06 Transporteurs Membranaires et Résistance (TMR) du docteur Anne Lespine étudie le rôle des transporteurs ABC dans le devenir des xénobiotiques chez les mammifères. En effet, l'équipe possède deux principales thématiques de recherche. L'une concerne l'étude des interactions entre des composés d'intérêts et les transporteurs ABC des mammifères, ainsi que des nématodes et l'autre porte sur la compréhension des mécanismes d'adaptation et de régulation des transporteurs chez ces organismes en réponse à une exposition à un composé toxique.

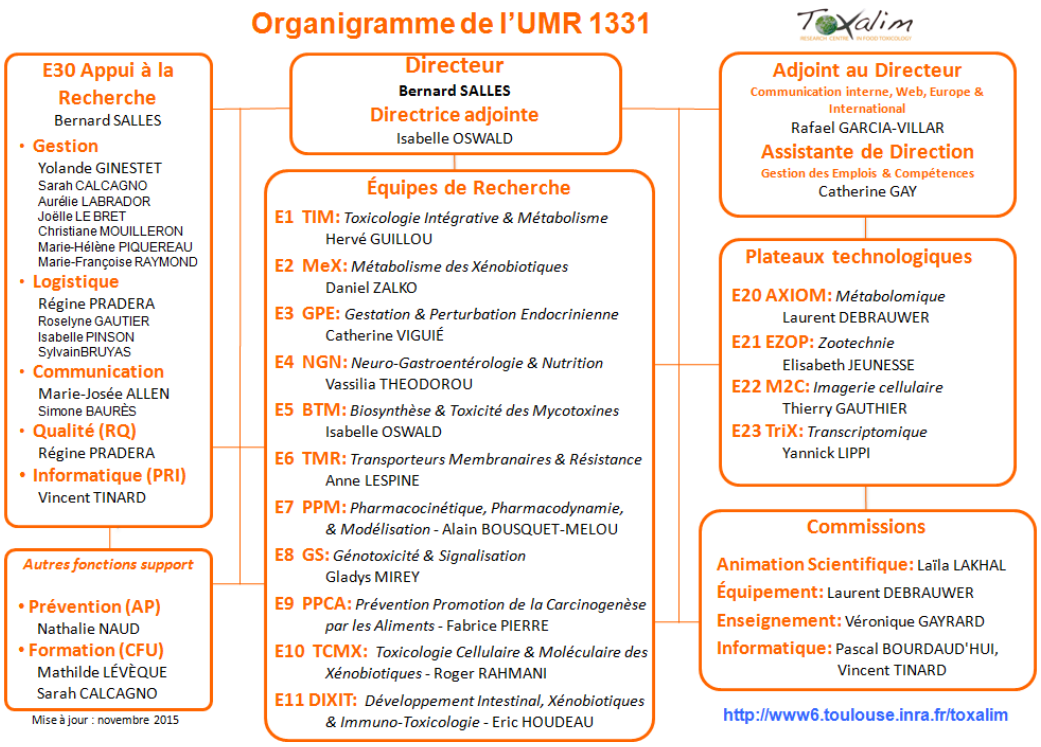


Figure 1 : Organigramme de l'UMR 1331.

2. Synthèse bibliographique.

2.1. La chimiothérapie antiparasitaire.

Les helminthes parasites regroupant les classes de nématodes, les trématodes, les cestodes et les acanthocephales, sont une des cause majeure de mortalité en santé humaine et vétérinaire. En agriculture, ces parasites causent des baisses de performances zootechniques entrainant de lourdes pertes économiques dans les élevages à travers le monde. Ces pertes économiques sont dues à une réduction de la fertilité, de la croissance, une diminution de la production de lait et de viande et parfois la mort des individus les plus infectés. Ce sont également des pathogènes humains qui infectent plus d'un milliard de personnes dans le monde.

Bien qu'un vaccin ait été mis sur le marché très récemment en Australie en 2014 pour l'infection par *Haemonchus contortus (H. contortus)* chez le mouton (*Schallig, 2000*), le recours aux médicaments anthelminthiques reste aujourd'hui la principale solution pour lutter contre ces helminthes parasites (*Lespine & al, 2012*).

2.1.1. Les différentes classes de médicaments anthelminthiques.

Les anthelminthiques désignent une classe de médicaments utilisés pour lutter contre ces infections à vers parasitaire. Ceux-ci agissent par action paralysante ou létale sur les parasites. Le premier anthelminthique apparu sur le marché fut la phénothiazine en 1939.

Depuis, plusieurs familles d'anthelminthiques ont vu le jour et sont classées selon leur nature chimique et leur mode d'action (tableau I). On trouve les benzimidazoles et pro-benzimidazole utilisés depuis plus de 50 ans, les imidothiazoles, les tétrahydropyrimidines et les lactones macrocycliques. Parmi ces anthelminthiques, les lactones macrocycliques (LMs) sont les plus utilisées de nos jours (*Prichard & al, 2012*).

Tableau I : Principaux anthelminthiques utilisés en médecine vétérinaire en France (Dictionnaires des médicaments vétérinaires, 15ème édition, 2009).

Familles	**Molécules**	**Cible pharmacologique**
Benzimidazoles	Albendazole Fenbendazole Mebendazole Oxfendazole	β- tubuline
Pro-benzimidazole	Febantal	
Imidothiazoles	Metronidazole Levamisole	Récepteur nicotinique à l'acétylcholine
Tétrahydropyrimidines	Pyrantel Oxantel	Récepteur nicotinique à l'acétylcholine
Lactones macrocycliques	Ivermectine Moxidectine Doramectine Abamectine Eprinomectine Selamectine Milbemycine	Canaux Chlorures Glutamates dépendants Canaux Chlorures GABA dépendants Canaux chlorures acétylcholines dépendants Canaux chlorures histamines dépendants

2.1.2. Les lactones macrocycliques.

Les LMs sont des produits de fermentation d'un microorganisme du genre Streptomyces et sont largement utilisées en thérapeutique vétérinaire et humaine du fait de leur action à large spectre et de leur efficacité contre les endo- et ectoparasites. Ces molécules sont classées en deux groupes : les avermectines et les milbémycines (*McKellar and Gokbulut, 2012*).

Les avermectines et les milbémycines : structure.

Les avermectines sont des produits de fermentation de *Streptomyces avermitilis*. Ils regroupent l'ivermectine, la doramectine, l'éprinomectine et la sélamectine. Les

milbémycines sont obtenues à partir de *Streptomyces cyaneogriseus* et *Streptomyces hydroscopieus* et comprennent la moxidectine, ainsi que la milbémycine oxime (*Shoop & al, 1995*) (figure 2).

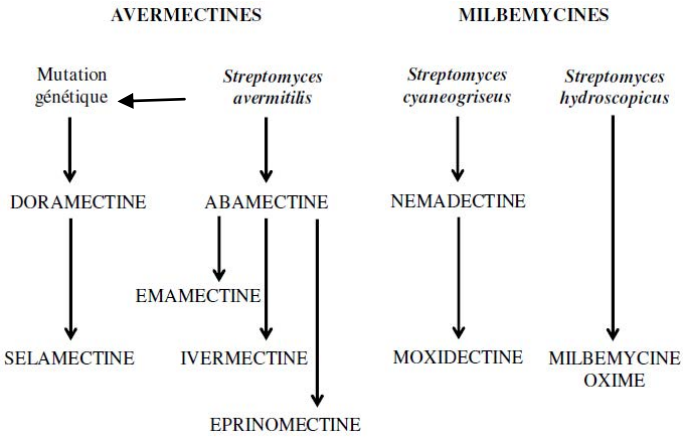


Figure 2 : Filiation schématique des lactones macrocycliques (*Prichard & al, 2012*).

Les lactones macrocycliques présentent dans leur structure un point commun : un macrocycle à lactone. Les deux sous-groupes de LMs présentent cependant des différences structurales. Dans notre étude, nous nous intéressons à une avermectine : l'ivermectine (IVM) et à une milbémycine : la moxidectine (MOX). L'IVM comprend un groupement saccharidique sur le carbone 13. La MOX est dépourvue de ce groupement saccharidique mais possède un groupement méthyl en C25 (*Prichard & al, 2012*) (figure 3).

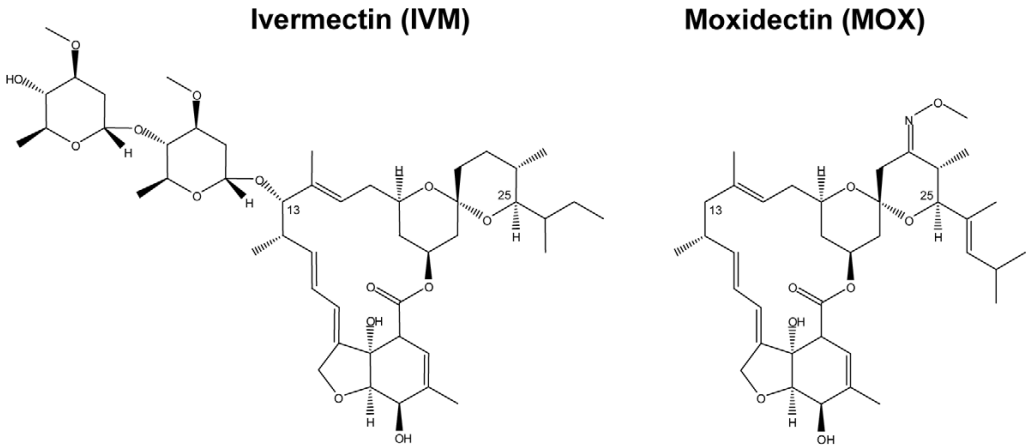


Figure 3 : Structures chimiques des avermectines (ivermectines) et des milbémycines (moxidectines) (*Ménez & al, 2012*).

Indications thérapeutiques :

La découverte des avermectines et des milbémycines fut un événement considérable en agriculture de par leur activité contre les arthropodes et les nématodes parasites. L'IVM fut la première LM disponible sur le marché au début des années 1980 et approuvée pour une

utilisation en médecine vétérinaire. Ces LMs présentent également une caractéristique intéressante : leur faible toxicité pour les mammifères. Ainsi, elles sont utilisées en agriculture dans le traitement des endoparasitoses du bétail telles que les strongyloses intestinales (*Haemonchus, Teladorsagia, Trichostrongylus, Cooperia, Trichus*) et pulmonaires (*Dictycaulus, Protostrongylus*) les ascaridioses, également dans le traitement des ectoparasites comme les insectes tels que le varron ou la gale. Elles sont également utilisées pour le traitement des animaux de compagnie contre *Dirofilaria,* parasite du chien (*Lespine & al, 2012*).

C'est dans ce contexte que l'IVM fut par la suite approuvée pour une utilisation en médecine humaine qui a aboutit au prix Nobel de Médecine en 2015. Chez l'homme, les infections à *Onchocerca volvulus,* une microfilaire, conduisent à l'apparition de graves séquelles comme la cécité ou l'éléphantiasis et sont un véritable fléau dans les pays du continent Africain ou de l'Amérique du Sud. En plus d'être utilisée dans le traitement de l'onchocercose, l'IVM est également préscrite dans le traitement des filarioses lymphatiques provoquées par *Wuchereria bancrofti*. Elle est ainsi distribuée en masse par milliards de doses dans ces régions dans le but d'éradiquer ces infections. L'IVM est aussi utilisée dans le traitement des acariens et des strongyloses (*Geary & al, 2010*).

L'IVM et la MOX possède globalement un même mode d'action et un spectre d'action similaires (*Prichard & al, 2012*). Des études cliniques sont actuellement en court pour aboutir à une autorisation de mise sur le marché de la MOX dans le traitement de l'onchocercose chez l'homme (*Awadzi & al, 2014*).

Mode d'action et pharmacocinétique des lactones macrocycliques :

Les LMs activent les canaux chlorures glutamates dépendants (GluCl) des nématodes, et de manière moins fréquentes les canaux chlorures gamma aminobutyrique dépendants (GABA), les récepteurs à l'acétylcholine, à l'histamine... (*Holden – Dye and Walker, 2014*). La perméabilité des canaux vis-à-vis des ions chlorures est alors accrue provoquant une hyperpolarisation de la membrane neuromusculaire ce qui entraine une paralysie flasque du corps musculeux et du pharynx et la mort du nématode. Malgré le mode d'action identique de l'IVM et de la MOX il semblerait que leur interaction avec les récepteurs au glutamate soit différente (*Prichard & al, 2012*).

La pharmacocinétique des LMs fait intervenir un processus de détoxification. Dans un permier temps la molécule va être métabolisée via des enzymes, les cytochromes P450 : CYP3A et CYP1A1 chez le rat (*Zeng & al, 1998*). Dans un second temps, la molécule va être

exportée hors de la cellule via des transporteurs ABC d'efflux : les P-gp (P-glycoprotéines) et les MRPs (Multidrug resistance-associated proteins). Leur fonction principale est le transport actif (ATP-dépendant) de composés endogènes ou exogènes dont les LMs. Ils sont impliqués dans la résistance chez de nombreux organismes. En effet les P-gp ont une grande variété de substrats comprenant les LMs. Chez l'homme un gène (abcb1) et deux gènes chez la souris (abcb1a et abcb1b) codant pour les P-gp sont identifiés et connus pour être impliqués dans la résistance aux anti-cancéreux (*Lespine & al, 2012*).

2.2. Emergence de résistances aux LMs.

L'usage intensif et parfois inapproprié de ces anthelminthiques a conduit à l'émergence de phénomène de résistance, avec l'apparition de souches de nématodes parasites capables de résister à l'action de ces médicaments (*Lespine & al, 2012*). Ces phénomènes de résistance sont un enjeu de santé publique car ils sont responsables de nombreux échecs thérapeutiques aussi bien en médecine vétérinaire qu'en médecine humaine.

2.2.1. Défintion de la résistance.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit la résistance comme un phénomène génétique, héritable, qui confère à un organisme la capacité de survivre à des concentrations en drogues habituellement létales. Ainsi, dans le cas des anthelminthiques, la résistance se définit par une population de nématodes ayant génétiquement acquis la capacité à résister à des concentrations d'antiparasitaires habituellement mortelles pour les individus de l'espèce. L'utilisation répétée des anthelminthiques induit une pression de sélection ayant pour conséquence d'augmenter le nombre d'individus possèdant le gène de résistance. A terme, cette situation conduit à l'obtention d'une population dans laquelle les individus portant le gène de résistance sont majoritaires.

2.2.2. Cas de résistance aux LMs.

Globalement toutes les espèces de nématode ont développées une résistance vis-à-vis des LMs. Certaines espèces sont cependant plus touchées que d'autres notamment *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus* ou encore *Cooperia* pour les LMs. La résistance aux anthelminthiques a pris une importance considérable dans les pays tels que l'Amérique du Sud, l'Afrique, la Nouvelle Zélande et l'Australie où est pratiqué l'élevage intensif. En Afrique du Sud plusieurs élevages ont du être éliminés par manque de traitement efficace contre *H. contortus*, nématode dominant dans ce pays. La résistance à l'ivermectine a été rapportée pour la première fois en 1988 en Afrique du Sud chez le parasite *H.contortus* (*Van Wyk and Malan, 1988*). Les pays d'Europe sont eux de plus en plus touchés par ce

phénomène de résistance. Le 1er cas de résistance en Europe fut décrit dans un élevage de bovins en 1999 au Royaume-Uni et concernait des résistances à *Cooperia oncophora (C. oncophora)* (*Sargison, 2007*). En France, la situation reste mal connue mais le 1er cas de résistance à l'IVM et à la MOX fut décrit en 2014 dans un élevage de chèvre (*Geurden & al, 2015*). Le phénomène de résistance est clairement établi par des bilans parasitaires pour l'IVM et la MOX bien que nous constations que cette dernière reste plus efficace que l'IVM (*Lespine & al, 2012*).

2.3. Mécanismes de résistance aux LMs chez les nématodes.

Les mécanismes de résistance aux LMs restent encore mal connu. Nous savons que la résistance peut être due à une modification structurale d'organes chimiosensoriels. Des résistances croisées ont également été mise en évidence. Plus rarement, la résistance peut intervenir au niveau des GluCl. Celle-ci est alors due à une modification qui affecte la sensibilité d'un récepteur des GluCl et notamment à une réduction du polymorphisme allélique sur des sous-unités de ces récepteurs. Chez *C. elegans* il a été montré que des souches résistantes à l'IVM présentent une réduction du polymorphisme de ces récepteurs. *Blackhall & al* (*1998*) a démontré qu'une diminution du polymorphisme allélique sur des sous-unités des GluCl était associée à une résitance à l'IVM et à la MOX chez *H.contortus*. Les cas pouvant conduire à une mutation des GluCl sont plus rares. Un seul cas a été décrit en 2004 par *Njue and Prichard* chez *C. oncophora* ; une mutation au niveau d'une sous unité des GluCl était à l'origine d'une résistance à l'IVM.

2.3.1. Modification de structures neuronales.

Des modifications structurales des neurones au niveau des amphides, organes chimiosensoriels impliqués dans la reconnaissance du milieu, due à des mutations dans les gènes de développement de ces structures ont été mises en évidence chez des isolats de nématodes parasites résistants à l'IVM (*H. contortus*) et également chez *Caenorhabditis elegans (C. elegans*). Ainsi, un défaut structural des neurones amphidiens : « dye-filling defective » est associé à une résistance à l'IVM et à une mutation sur un des gène de développement de cette structure : *dyf-7* (*Urdaneta-Marquez & al, 2014)*.

2.3.2. La résistance croisée.

Les mécanismes de résistance croisée mettent en jeu les processus de détoxification. Une surexpression de gène de certains transporteurs ABC tels que des P-glycoprotéines (P-gp) ou les Multi Drug Resistance Associated proteins (MRP), qui constituent des pompes à efflux des antiparasitaires, sont impliqués dans la résistance aux LMs (*Prichard & al, 2012*).

Chez *C. elegans*, 14 gènes homologues des P-gp ont été observés à tous les stades de développement. Ils sont localisés dans les cellules intestinales, le pharynx et au niveau des amphides (*Holden-Dye and Walker, 2014*). Plusieurs études soutiennent l'implication des P-pg dans la résistance aux LMs chez les nématodes. Dans un premier temps, *De Graef & al (2012)* a identifié des différences entre souches résistantes et souches sensibles pour les gènes codant les transporteurs ABC chez *C. oncophora* avec notamment une augmentation du niveau de transcription des ces gènes chez la souche résistante. *Janssen & al (2013)* a montré que des souches de *C. elegans* déficientes en P-gp étaient plus sensibles à l'IVM. De plus, *Demeler & al (2013)* a montré que l'utilisation d'un inihibteur de P-gp (le vérapamil) augmente la sensibilité de *C.oncophora* à l'IVM et restaure la sensibilité chez des souches résistantes. Des études suggèrent que chez les nématodes, la MOX serait un inhibiteur moins performant de la P-gp contraitement à l'IVM (*Lespine & al, 2007*).

2.4. Le modèle *Caernohabditis elegans*.

C. elegans est un nématode libre (non parasite) présent dans les sols de climat tempéré ou sur les fruits en décomposition. Sa nourriture se constitue de microorganismes tels que les bactéries. C'est un organisme multicellulaire facilement cultivable à reproduction rapide et son anatomie est représentative de la plupart des nématodes. C'est également un organisme hermaphrodite qui produit des œufs et des spermatozoïdes. C'est dans ces conditions que *C. elegans* constitue l'un des organismes les plus intensément étudié (*Simon Fraser University, 2016*).

2.4.1. Utilisation en laboratoire.

Ce nématode a été introduit dans les laboratoires de génétique au début des années 1960, par S. Brenner comme système « modèle », pour étudier notamment la biologie du développement et du fonctionnement du système nerveux (*Brenner, 1974*). En effet, la simplicité générale de cet organisme, sa facilité d'élevage et sa transparence en font un très bon modèle d'étude. Son génome de 97 Mb est entièrement séquencé (*The C. elegans sequencing consortium, 1998*) et de nombreux mutants sont disponibles.

De plus, il existe une homologie entre les gènes de *C. elegans* et ceux des nématodes parasites (supérieure à 40%). En effet, *C. elegans* appartient au Phylum des Nematoda et à l'ordre des Rhabditina (Clade V). Dans ce Clade V, nous retrouvons également des espèces de nématodes parasites tels que *H. contortus, Ostertagia ostertagi, T. circcumcinta*. Ainsi, il y a conservation des processus biologiques entre *C. elegans* et ces nématodes parasites le

définissant comme modèle d'étude extrapolable aux parasites (*Holden-dye and Walker, 2014*).

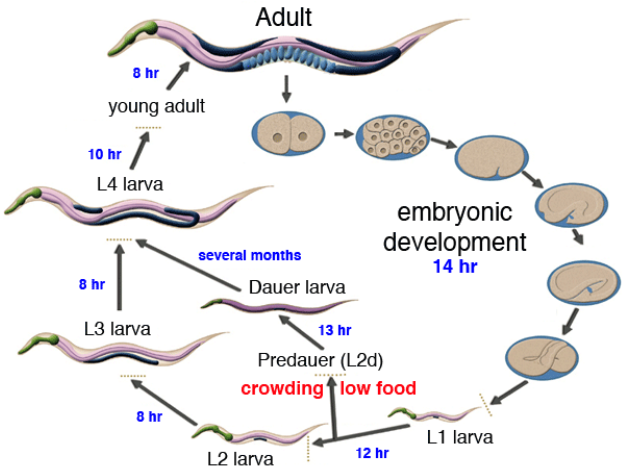


Figure 4 : Cycle de développement de *C. elegans* à 22°C (*Altun and Hall, ©Wormatlas*).

2.4.2. *Anatomie et cycle de développement.*

C. elegans est un organisme possèdant une structure anatomique simple. Ce vers rond non-segmenté possède un corps cylindrique entouré d'une cuticule. Sous cette cuticule est sous-tendu par 4 cordons musculaires, l'appareil digestif et glandulaire. Schématiquement ces organes sont tubulaires. Ce nématode ne possède ni système circulatoire, ni système respiratoire. En revanche, il possède un système nerveux bien développé, avec un anneau nerveux situé à la base du pharynx avec des motoneurones et des neurones sensoriels au niveau de la tête, qui se prolongent par deux cordons nerveux à travers le corps et se finissent en se rassemblant au niveau de la queue.

C. elegans est un organisme avec une durée de vie moyenne de 2 à 3 semaines et un cycle biologique court. Il comprend un stade embryonnaire, 4 stades larvaires (de L1 à L4) et un stade adulde (figure 4). Un adulte est capable de pondre 300 œufs par ponte. Le temps de croissance est dépendant de la température, à 20°C il faut 3 jours pour passer du stade œuf au stade adulte. D'autres facteurs affectent la croissance de *C. elegans*, ainsi par manque de nutriments ou par densité élevée de population, l'organisme passe en stade Dauer. Le stade Dauer ne se nourrit pas et peut survivre dans des conditions défavorables plusieurs mois jusqu'à ce que celles-ci s'améliorent, l'organisme passe alors au stade L4 (*Couillault and Kurz, 2010*).

2.5 « Fitness » et réversion de la résistance.

La « fitness » est la valeur sélective d'un individu soit sa capacité à se reproduire. Il est admis que des individus se trouvant dans un environnement défavorable, stressant, ont une

reprodution et une ponte diminuées. Ainsi, une pression de sélection induite par un anthelminthique créée un environnement stressant, diminuant la « fitness » de l'organisme, on parle de coût associé à la résistance. C'est en effet ce qui a été démontré par l'équipe E06 de Toxalim ; des souches résistantes aux LMs, obtenues par pression de sélection avec des doses croissantes d'IVM ou de MOX durant 40 semaines, présentent toute deux une diminution du nombre de descendants ainsi qu'une diminution du nombre de descendants fertiles, capablent d'atteindre le stade adulte et de se reproduire (Communication personnelle).Ceci suggère qu'une potentielle réversion des souches résistantes est à envisager. La réversion de la résistance se définit par un retour à la sensibilité d'une population résistante. La réintroduction du caractère sensible dans la population peut favoriser un retour à la sensibilité, on parle de brassage génétique.

A contrario, d'autres études suggèrent que la gestion du stress induit par les anthelminthiques a des effets bénéfiques comme une meilleure résistance à d'autres stress, ou une augmentation de la longévité. On parle de réponse hormétique (*Cypser and Johnson, 2002) (Zhou & al, 2011*). Il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes adaptatifs mis en place dans le but d'appréhender les conséquences biologiques d'une résistance aux LMs.

1.4. Objectifs du stage.

L'apparition de résistance aux LMs en réponse aux pressions de sélection que ces médicaments exercent est susceptible d'entrainer en parallèle la mise en place de coûts adaptatifs. En effet, la sélection d'isolats de nématodes résistants aux LMs et la réduction de la diversité génétique associées à cette sélection est suceptible d'induire une diminution du potentiel adaptatif face à d'autres contraintes. Ces problématiques posent plusieurs questions de recherches : d'une part, l'acquisiton de résistance aux LMs induit-elle une augmentation de la sensibilité vis-à-vis d'autres stress, sous entendu existe-il un coût associé à la résistance ? D'autre part, l'acquisition de la résistance est – elle réversible ?

Dans ce contexte, cette étude vise à déterminer l'adaptation de populations d'un nématode modèle, *C. elegans*, soumis ou non à des pressions de sélection par les LMs, et à mesurer les coûts adaptatifs de cette acquisition de tolérance aux LMs. Ainsi, sera étudié, l'analyse des modifications phénotypiques en termes (i) de sensibilité aux LMs, (ii) de résistance à différents stress (osmotiques, thermiques, salins), (iii) de trait d'histoire de vie (longévité).

II. MATERIELS ET METHODES

1. Matériels.

L'ivermectine, le paraquat dichloride, le cholestérol, le NaOH, l'hypochlorite de sodium 10-15%, le diméthyl sulfoxide, l'éthanol 70% et les sels ($CaCl_2$, $MgSO_4$, KH_2PO4, Na_2HPO_4) sont fournis par Sigma-Aldrich (Lyon, France). Le K_2HPO_4 provient d'ICN Biomedicals (Ohio, USA). Le NaCl et l'Agar 2% viennent d'Euromedex (Mundolsheim, France). Le bactopeptone vient de Becton, Dickinson and Company (France). Le LB Broth Base (Lennox LB Broth Base) provient de Invitrogen™. La moxidectine est fournie par Fort Dodge International (Fort Dodge, IA). L'ivermectine et la moxidectine sont solubilisées dans du DMSO à 10 µg/ml provenant de Sigma-Aldrich (USA) et stockées à température ambiante à l'abri de la lumière. Le M9 est une solution à partir de 5, 68g de K_2HPO_4, 3g de Na_2HPO_4, 5g deNaCl, complété à 1L d'eau stérile déminéralisée et 1 mL de solution $MgSO_4$ à 1M. La solution de 1 litre de S-Basal est préparée à partir de 5,85g de NaCl, 1g de K_2HPO_4, 6g de KH_2PO_4, 1 mL de cholestérol à 5 mg/mL (solubilisé dans l'éthanol) est complétée à 1 litre avec de l'eau déminéralisé stérile puis filtrée à l'aide d'un kit de filtration. La solution de 1 litre de S-complete est préparée à partir de 1 litre de solution S-Basal, 10 mL de potassium citrate 1M à pH6, 10 mL de trace metals solution, 3 mL de $CaCl_2$ à 1M, 3 mL de $MgSO_4$ à 1M, 1 mL de cholestérol à 5 mg/mL puis filtrée avec un kit de filtration. La solution de Dil est préparée à partir 1 mg de poudre de Dil (INVITROGEN) 1,1'- Didodecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate diluée dans 500 µL de DMSO.

2. Souches de *C. elegans* utilisées pour l'étude.

La souche sauvage de *C. elegans* N2 Bristol (N2B) a été fourni par le CGC (Caenorhabditis Genetics Center). A partir de N2 Bristol des souches résistantes ont été sélectionnées. La souche ivermectine résistante (IVR10) maintenue sur pression de sélection à 10 ng/mL d'IVM est fournie par l'Université McGill (Québec, Canada). La souche moxidectine résistante (MOX4R) a été développé par l'équipe d'accueil par pression de sélection selon le protocole de *James and Davey (2009)*. Briévement, la souche sauvage N2 Bristol a été transférée sur un milieu de culture contenant 1 ng/mL de drogue. Après un cycle de reproduction la population a été transférée sur un nouveau milieu de culture contenant 2 ng/mL de drogue. Lorsque les vers sont en mesure de croitre et de se reproduire ils ont été transférés sur un milieu contenant la même concentration en drogue et sur un milieu contenant une concentration plus élevée en drogue. Cette manipulation a été répétée jusqu'à l'obtention

de souche résistante à 3,8 ng/mL de moxidectine pour les MOX4R. Les souches maintenues en pression de sélection sont nommées IVR10 + PS et MOX4R + PS. Parallèlement, la pression de sélection est levée pour ces souches afin d'étudier la réversion de la résistance. Les souches sont nommées IVR10 – PS et MOX4R – PS.

3. Maintien des souches et synchronisation de population.

Les souches sont maintenues sur un milieu NGM classique (Nematode Growth Medium) composé de 0.75g de NaCl, 0.5g de bactopeptone, 4.25g d'Agar 2% et 250 mL d'eau MilliQ (eau ultra pure déminéralisée) et enrichi avec 0.25 mL de CaCl2 1M, 0.25 mL de cholestérol à 5mg/mL, 0.25 mL de MgSO4 à 1M et 6.25 mL de KPO4 Buffer 1M à pH6. Le milieu NGM est coulé en boite de pétri de 6 cm de diamètre et ensemencé avec 250 µL d'une culture fraiche d'*Escherichia coli* OP50 qui constitue la nourriture de *C. elegans*.
Les souches sont maintenues à 21°C et repiquées deux fois par semaines sur des nouvelles boites de pétri. En vue d'un test de Larval Development Assay (LDA) les souches IVR10 + PS sont repiquées sur du milieu NGM complémenté à 2 ng/mL d'IVM et les souches MOX4R + PS sont repiquées sur du milieu NGM complémenté à 0,5 ng/mL de MOX.

La synchronisation d'une culture de *C. elegans* permet d'obtenir une population où tous les individus sont au même stade de développement. Pour cela, une culture de *C. elegans* composée majoritairement d'adultes gravides et d'œufs est traitée par une solution composée de NaOH 5N, d'hypochlorite de sodium 10-15% et de M9. Ce traitement permet de lyser tous les stades larvaires exceptés les œufs. Ceux-ci sont mis à éclore une nuit à 21°C sans nourriture permettant ainsi d'obtenir une population de L1 parfaitement synchronisée.

4. Test de développement larvaire (Larval Development Assay, LDA).

Le test du LDA consiste à suivre le développement de larve au stade L1, exposées à des concentrations croissantes en IVM et MOX, jusqu'au stade adulte. Pour cela, des plaques 12 puits contenant du milieu NGM avec la quantité appropriée d'IVM ou de MOX afin d'établir une gamme de concentration en LMs. Les puits sont ensuite ensemencés avec 15 µL d'une culture fraiche *d'Escherichia coli* OP50. L'IVM est ajoutée pour une gamme de concentration de 0 à 35 nM et la MOX pour une gamme de concentration de 0 à 18 nM. La quantité de DMSO n'excède pas les 0,5%. Pour le contrôle, les vers sont exposés au DMSO seul. 30 L1 des souches IVR10 + PS, MOX4R + PS, IVR10 – PS et MOX4R – PS sont déposés par puits et mis à incubés à 21°C jusqu'au stade adulte. Le pourcentage d'individus ayant atteint le stade adulte est calculé par rapport au contrôle et les résultats sont traités sur le logiciel

GraphPad qui fournit une valeur d'EC50 (concentration effectrice de drogue pour laquelle 50 % des individus n'ont pas atteint le stade adulte).

5. Dye filling assay (test de coloration des neurones des amphides)

Afin de visualiser les amphides (structures contenant les neurones chimiosensoriels) chez *C. elegans* ; des individus de la souche sauvage N2B, des souches résistantes IVR10 + PS et MOX4R + PS et des souches où la pression de sélection à été levée IVR10 – PS et MOX4R – PS sont synchronisées au stade L4. Les vers sont ensuite incubés dans une solution de dye à 10 ng/mL de solution stock de Dil et mis sous agitation à 21 °C pendant 2 heures. Après une période de récupérération de 2 heures sur boite NGM complémenté en *E. coli* OP50 (permet à la solution de Dil de passer le tractus digestif), les vers sont paralysés avec du levamisole (40 mM) et le marquage des neurones amphidiens est observé avec un microscope Nikon Eclipse 50i équipé d'une camera Luca S et analysée via le logiciel Nikon ACT-1.

6. Test de chimiotactisme.

Une boite de pétri NGM classique est divisée en 4 quadrants égaux. Un dépôt bactérien est effectué dans les 2 quadrants opposés (Figure 5, A et B) à 2cm du centre de la boite de pétri. Un cercle de 1cm de diamètre est délimité au centre de la boite. La population est synchronisée pour obtenir des vers au stade jeune adulte. Ceux-ci sont déposés au centre de la boite de pétri et incubés à 21°. Toutes les 30 minutes et pendant 2h30 le nombre de vers sortis du cercle et ayant atteint le quadrant comportant le dépôt bactérien sont comptés. Un indice de chimiotactisme (CI) est calculé selon la formule suivante :

$$CI = \frac{(A + B) - (C + D)}{Nombre\ total\ de\ vers}$$

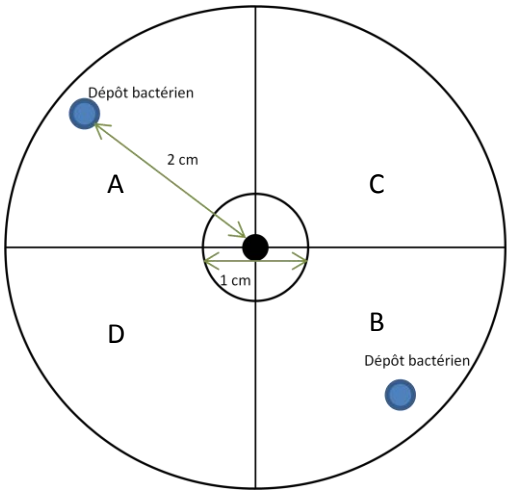


Figure 5 : Représentation schématique du test de chimiotactisme.

7. Tolérance au stress oxydatif.

Le paraquat est utilisé pour tester la tolérance au stress oxydatif chez les souches résistantes IVR10 + PS et MOX4R + PS en comparaison à la souche sauvage N2B. Une solution mère de paraquat à 600 mM est préparée à partir de 100 mg de poudre de paraquat dichloride solubilisée dans 648 µL d'une solution S-complete. Des vers au stade L4 sont déposés dans des puits de plaques 96 puits contenant 300 mM de paraquat dilué dans du S-complete. Parallèlement les mêmes souches sont déposées dans des puits contenant uniquement du S-complete pour servir de contrôle de survi. Les souches sont placées à 21°C et la mobilité est évaluée après 0, 1, 3 et 6 heures d'incubation. Les vers ne présentant aucun mouvement, même uniquement de la tête sont comptés comme morts.

8. Tolérance au stress osmotique.

Le NaCl est utilisé pour tester la tolérance au stress osmotique chez les souches résistantes IVR10 + PS et MOX4R + PS en comparaison à la souche sauvage N2B. Des vers au stade L4 sont placées sur gélose NGM classique avec *Esherichia Coli* OP50 comme source de nourriture et complémentées avec 500mM de NaCl. Parallèlement les mêmes souches sont placés sur milieu NGM classique avec *Escherichi Coli* OP50 comme source de nourriture pour servir de contrôle de survie. Les souches sont placées à 21°C et la mobilité est comptabilisée immédiatement après le dépôt et après 3, 5, 7, 9 et 11 minutes. Le critère suivi est la mobilité. Les vers ne présentant aucun mouvement, même uniquement de la tête sont comptés comme morts.

9. Tolérance au stress thermique.

La tolérance au stress thermique est testée sur les souches résistantes IVR10 + PS et MOX4R + PS en comparaison à la souche sauvage N2B. Des vers au stade L4 sont placés sur gélose NGM classique avec *Esherichia Coli OP50* comme source de nourriture. Les vers sont placés 6 heures à 37°C. Parallèlement les mêmes souches sont placées sur milieu NGM classique avec *Escherichi Coli OP50* comme source de nourriture est placées à 21°C pendant 6 heures pour servir de contrôle de survie. La survie est comptabilisé à 0, 2, 3 et 6 heures et les vers sont considérés comme mort si ils ne répondent pas à un stimulus par fil de platine.

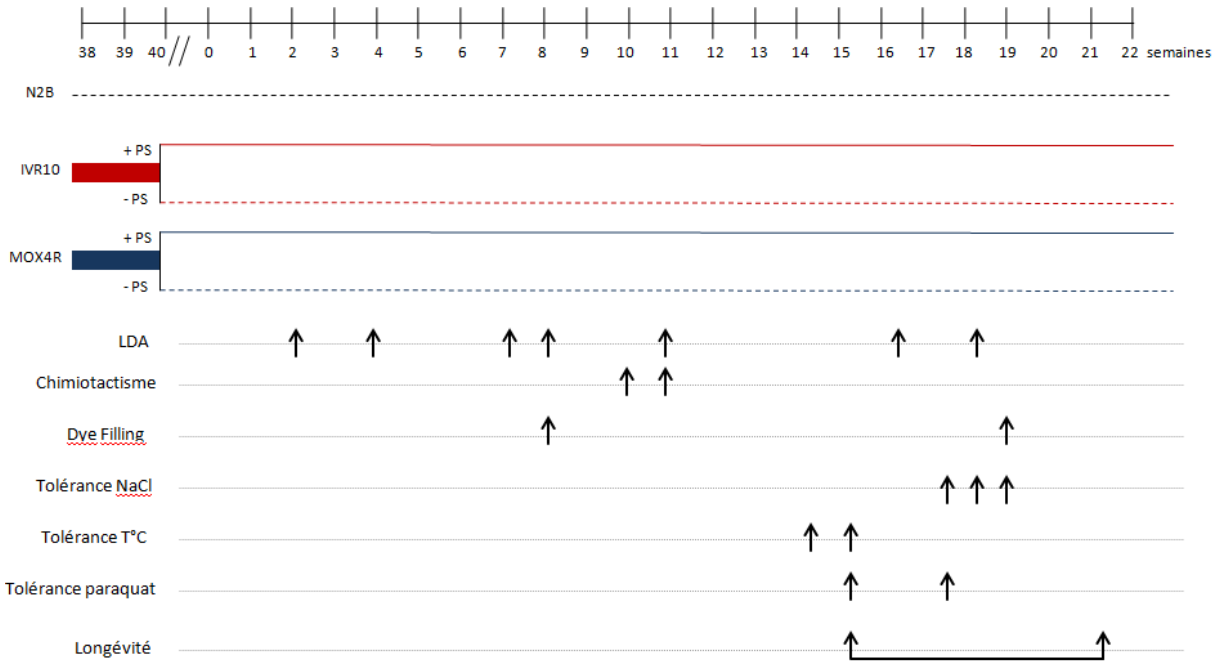
10. Test de longévité en milieu liquide.

Selon le protocole de *Lionaki et Tavernaraki (2013)*, la longévité est testée sur les souches résistantes IVR10 + PS et MOX4R + PS en comparaison à la souche sauvage N2B. Une solution de 30 vers au stade L1 complémentée avec une solution d'*E.coli* OP50 à 6mg/mL est déposée dans chaque puits d'une plaque 96 puits. La plaque est sellée pour éviter l'évaporation est mise à incuber à 21°C. Au stade L4, une solution de FUDR à 0,6 mM est ajoutée dans chaque puits afin de stériliser les animaux. Cette étape constitue le temps J0 à partir duquel les vers sont comptés trois fois par semaine. Les individus sont considérés comme vivant si ils sont en mouvement. Chaque semaine 5 µL d'une solution d'*E.coli* OP50 à 100 mg/mL est ajoutée comme source de nourriture et les plaques sont oxygénées pendant 1 minutes. La longévité moyenne est déterminée lorsque 50% des individus sont vivants.

11. Analyses statistiques.

Les valeurs expérimentales sont exprimées par la moyenne ± l'écart-type (SD) ou l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 4. Un test d'analyses de variance à deux facteurs (ANOVA 2) est utilisé pour étudier l'effet de la variable « temps » et de la variable « souche » suivi d'un test post-hoc de Bonferroni pour chaque souche résistante vis-à-vis de la souche sauvage à un temps donné. La significativité statistique est attribuée pour des valeurs de $p<0.05$ * et pour des valeurs de $p<0.01$ ** et $p<0,001$ ***.

12. Récapitulatifs chronologiques des tests effectués.



III. RESULTATS

Un tableau récapitulatif de l'ensemble des résultats est disponible en Annexe A.

1. Réversion de la résistance aux LMs chez *C. elegans*.

L'efficacité des LMs est suivie en mesurant le développement de larves L1 en adultes en présence de concentration croissantes d'IVM et de MOX. Une concentration efficace (EC50) pour laquelle 50 % des individus n'a pas atteint le stade adulte est calculée sur plusieurs semaines (figure 6 et tableau II).

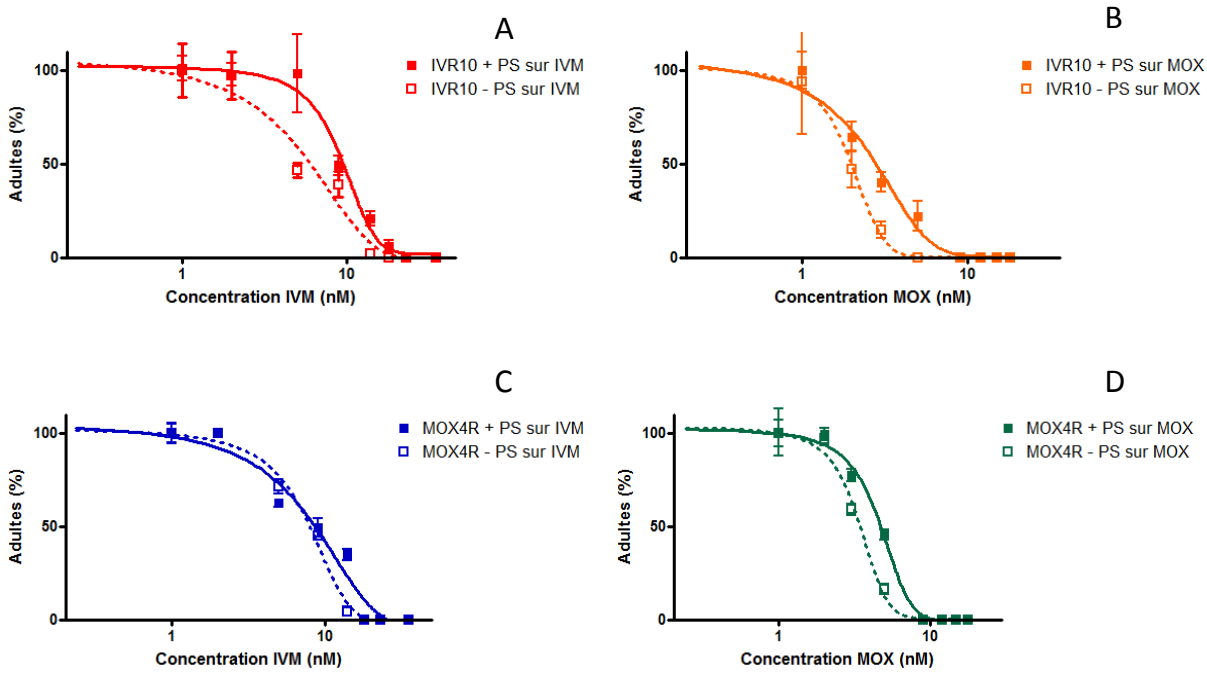


Figure 6 : Effet de l'IVM et de la MOX sur le développement larvaire chez *C. elegans* chez les souches IVR10 après 16 semaines sans pression sur l'IVM (A) ou sur la MOX (B) et MOX4R après 18 semaines sans pression sur l'IVM (C) ou sur la MOX (D). Les valeurs représentent les pourçentages d'adultes issus de L1 après 62 h d'incubation à 21°C, en présence de concentrations croissantes d'IVM ou de MOX. Moyenne ± SEM d'une expérimentation avec 3 valeurs.

Tableau II : EC50 de l'IVM et de la MOX. Les concentrations effectrice inhibant 50 % du développement des L1 en adultes sont déterminées pour les souches IVR10 après 16 semaines sans pression de sélection et MOX4R après 18 semaines sans pression de sélection. Les résultats sont exprimés en nM.

	IVR10 + PS	IVR10 - PS	MOX4R + PS	MOX4R - PS
IVM (nM)	9,2	5,7	9,3	7,8
MOX (nM)	2,1	1,9	4,6	3,3

Chez les souches IVR10, nous observons une différence d'EC50 entre la souche maintenue sur pression de sélection et celle qui est maintenue sans pression de sélection pour

les deux LMs : IVM et MOX. En effet, on note une EC50 de 9,2 nM pour la souche IVR10 + PS sur l'IVM contre 5,7 nM après 16 semaines sans pression de sélection à l'IVM pour la souche IVR10 – PS. De la même manière, après 16 semaines sans pression de sélection, l'EC50 de la souche IVR10 vis-à-vis de la MOX diminue de 2,1 à 1,9 nM. Une tendance similaire est observée pour les souches sélectionnées sur la MOX. En effet, après 18 semaines sans pression de sélection à l'IVM on observe une diminution de l'EC50 de 9,3 nM à 7,8 nM, pour les MOX4R + PS et MOX4R – PS, respectivement.

Ces observations nous permettent de conclure que l'absence de pression de sélection augmente la sensibilité des souches résistantes aux deux LMs.

Le ratio des EC50 souches avec pression de sélection/souches sans pression de sélection est présenté sur la figure 7 pour les IVR10 et les MOX4R sur chaque drogue (IVM et MOX). Un ratio de 1 équivaut à un maintien de la résistance aux LMs.

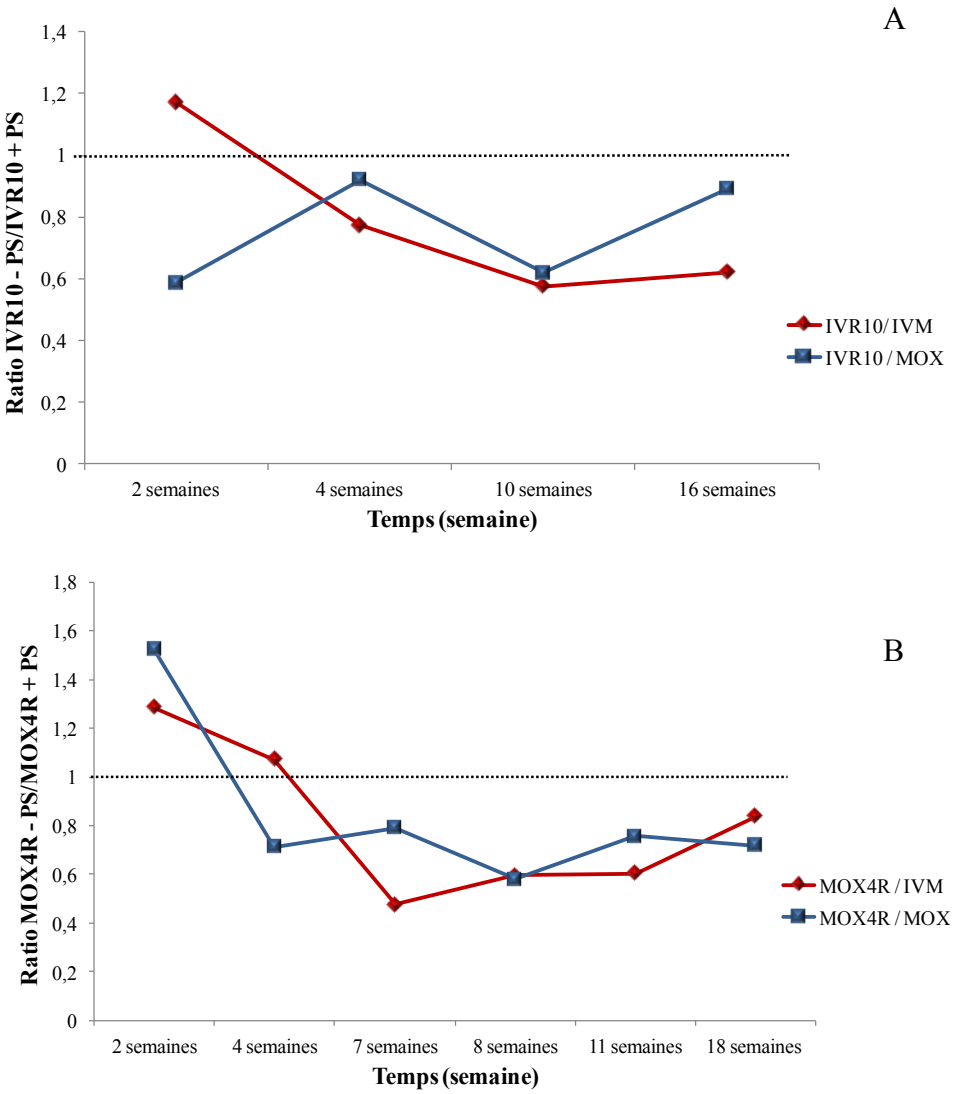


Figure 7 : Ratio des valeurs EC50 souches avec pression de sélection/souche sans pression pour les IVR10 (A) et les MOX4R (B) avec l'IVM et la MOX.

Les valeurs des ratios des EC50 sont comparées à un ratio de 1 qui correspond à la valeur attendue lorsque la résistance est maintenue constante. Concernant les souches IVR10 sur IVM, le ratio des EC50 atteint 0,6 après 16 semaines, témoignant d'une augmentation de la sensibilité à l'IVM. Au vue des résultats obtenus dans le cas des IVR10 testées sur la MOX, la variabilité dans les manipulations a été calculée et comparée à celle obtenue précédemment par l'équipe sur le même test. Celle obtenue ici est trop élevée pour conclure sur une modification de la sensibilité des IVR10 vis-à-vis de la MOX. Concernant les souches MOX4R, une augmentation de la sensibilité aux deux LMs est noté ; après 7 semaines sans pression de sélection à l'IVM le ratio est de 0,5 et après 8 semaines sans pression à la MOX on obtient un ratio de 0,6.

Au vue de ces résultats on peut conclure à la réversion partielle de la résistance et donc une tendance à un retour partiel à la sensibilité des souches résistantes vis-à-vis de l'IVM et de la MOX sur la période considérée dans ces conditions. Cependant on ne peut conclure sur les souches IVR10 cultivées en présence de MOX car les valeurs obtenues sont trop variables en comparaison à celle générées par l'équipe précédemment.

2. Intégrité des structures neuronales des amphides.

Le phénotype de dye-filling chez le nématode correspond à la capacité du vers à émettre de la fluorescence au niveau du principal organe chimiosensoriel de *C. elegans* : les amphides. Il est connu qu'une déficience de marquage des amphides («dye-filling defective »), correspondant à une structure alterée des neurones amphidiens, est associée à une résistance à l'IVM chez *C. elegans* (*Urdaneta & al, 2014*) et à la MOX (*Ménez & al, 2016*). Nos résultats montrant un retour partiel de la sensibilité des souches résistantes en absence de pression de sélection, un test de dye-filling est effectué sur la souche sauvage N2B servant de contrôle, sur les souches résistantes IVR10 + PS et MOX4R + PS et sur les souches non soumises à la pression de sélection par la drogue IVR10 – PS et MOX4R – PS. La figure 8 présente les résultats du pourçentage d'individus déficients pour le marquage des amphides pour chaque souche. La figure 9 présente les résultats obtenus pour chaque souche.

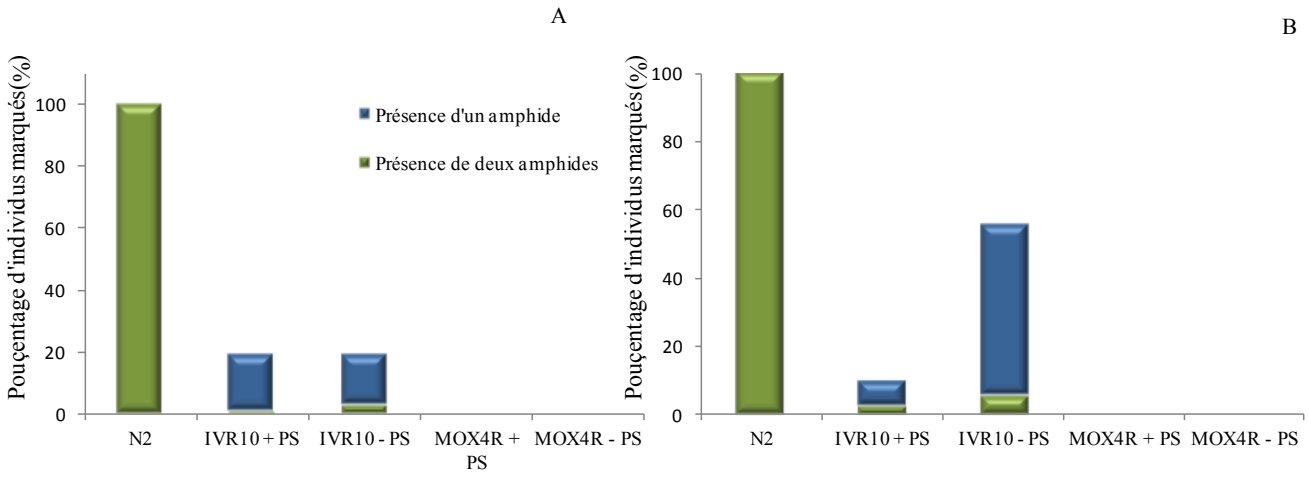


Figure 8 : Proportion d'individus possèdant un ou deux amphides marquées. Manipulation après 8 semaines sans pression de sélection (A) et après 19 semaines sans pression de sélection (B). Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 essais pour environ 100 vers par condition.

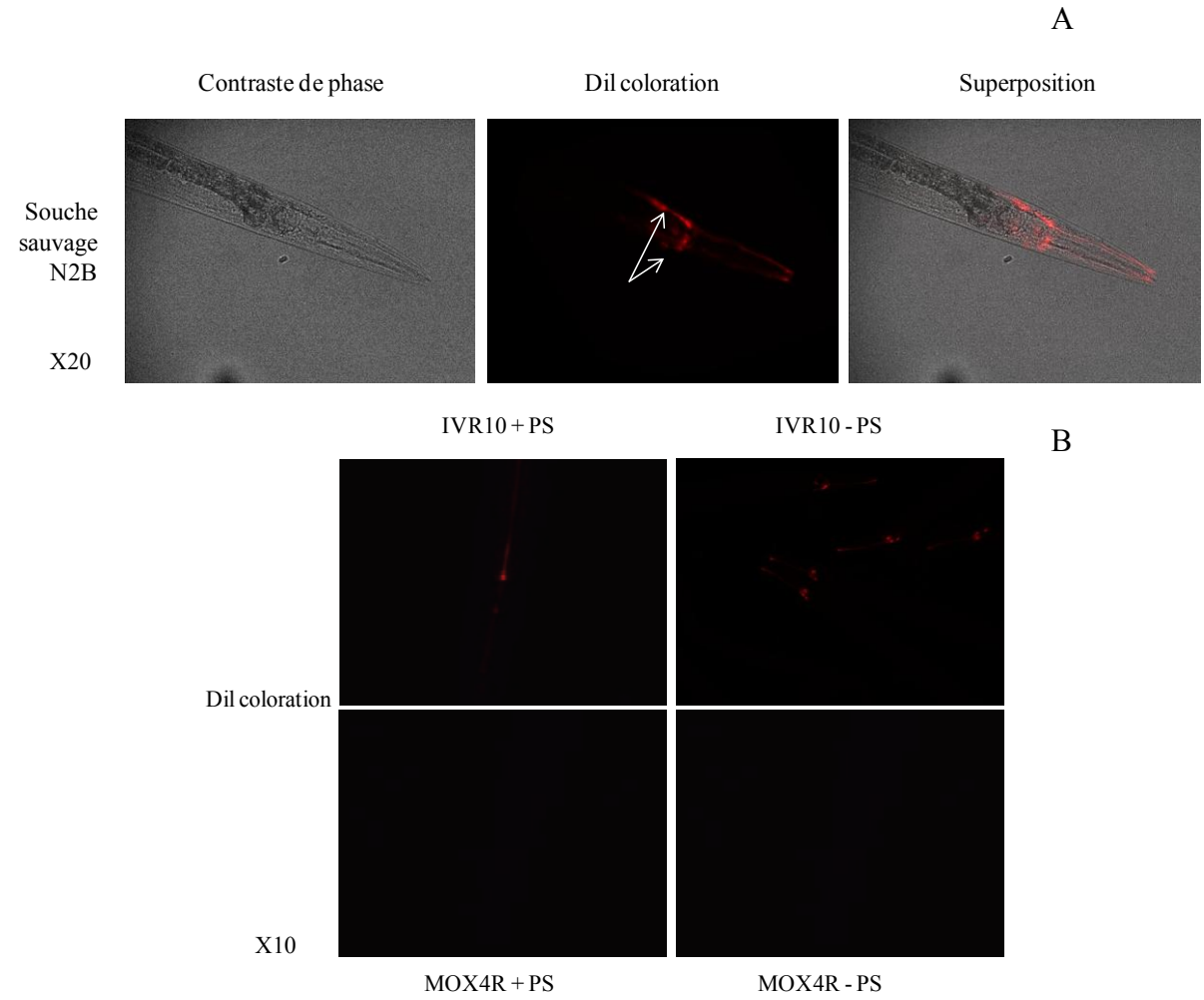


Figure 9 : Phénotype « dye-filling defective » pour les neurones des amphides (partie antérieure de *C. elegans*) chez la souche N2B (A), IVR10 + PS, IVR10 – PS, MOX4R + PS et MOX4R – PS après 19 semaines sans pression de sélection (B). Les flèches indiquent la présence des neurones des amphides.

Un premier test de dye-filling a été réalisé 8 semaines après la levée de la pression de sélection (figure 8A) et les résultats montrent que les souches IVR10 + PS sont à 80% déficientes en amphide et à 90% déficiente après 19 semaines. De façon interessante, la figure 8B montre clairement qu'après 19 semaines sans pression de selection, 50% des individus de la souche IVR10 - PS possèdent une structure normale visible sur la figure 9B. Les observations phénotypiques montrent une morphologie normale (présence des deux amphides) des neurones amphidiens pour la souche sauvage N2B (figure 9A).

Les résultats montrent que les MOX4R ont un phénotype 100% déficient en marquage amphidien quelque soit les conditions de culture et le temps écoulé sans pression de sélection (avec ou sans pression de sélection).

Ces résultats confirment que la sélection par les LMs induit un défaut de structure des neurones amphidiens. Cependant, un retour à un phénotype sauvage semble possible dans le cas où la pression de sélection à l'IVM est levée. Par contre, chez les MOX4R, les individus restent déficients après 19 semaines sans pression à la MOX.

3. Etude du chimiotactisme vis-à-vis de la nourriture chez *C. elegans*.

Compte tenu du rôle des amphides dans la reconnaissance du milieu et au vu des résultats obtenus lors du test de dye-filling, nous avons effectué un test de chimiotactisme vis-à-vis de la nourriture. En effet, les amphides sont des structures neuronales chimiosensoriels, potentiellement impliquées dans la reconnaissance de nourriture. Un indice de chimiotactisme est calculé pour chaque souche ; plus la valeur de l'indice se rapproche de 1, plus les vers sont capablent de détecter la nourriture (figure 10).

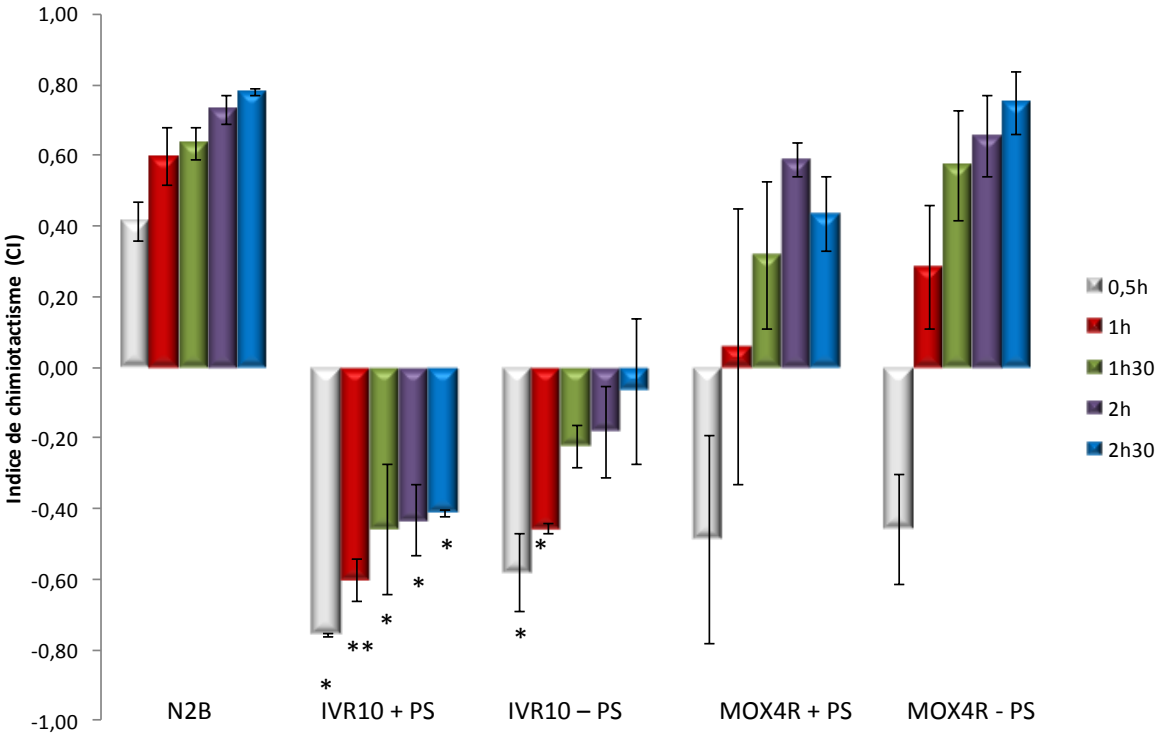


Figure 10 : Indice de chimiotactisme vis-à-vis de la nourriture *E.coli* OP50 pour la souche sauvage N2B et les souches résistantes IVR10 + PS et MOX4R + PS et les souches IVR10 – PS et MOX4R - PS après 10 et 11 semaines sans pression de sélection. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 essais indépendants (3 réplicats par essai) pour environ 20 vers par condition. Moyenne ± SEM. Test ANOVA 2 : *p<0,05, **p<0,01 pour chaque souche vis-à-vis de la souche sauvage N2B à un temps donné.

Concernant la souche N2B contrôle, la valeur de l'indice augmente progressivement de 0,4, après seulement 30 minutes d'exposition, pour atteindre 0,8 à 2 heures et 30 minutes. Ces résultats relfètent une capacité des N2B à détecter la nourriture. En revanche, les valeurs sont différentes entre la souche sauvage N2B et les souches résistantes (IVR10 + PS et MOX4R + PS) à 0,5 heures avec un indice de 0,4 pour la souche N2B, -0,8 pour IVR10 + PS et -0,5 pour MOX4R + PS. Ces résultats suggèrent un défaut de reconnaissance immédiat de la nourriture chez les souches résistantes. On distingue deux groupes de réponse au chimiotactisme par la nourriture ; les souches IVR10 + PS ne palient pas leur défaut de détection de la nourriture (indice de CI de -0,4 à 2 heures 30 minutes) tandis que la souche MOX4R + PS atteint un indice de CI de 0,4 à 2 heures 30 minutes.

Ces résultats nous montrent que la levée de pression de sélection n'améliore pas la capacité des vers à détecter la nourriture. Dans le cas des souches résistantes à l'IVM, la suppression de la pression de sélection à la drogue ne permet pas aux individus de palier à leur défaut de reconnaissance de nourriture. En effet, au bout de 2 heures et 30 minutes les

souches IVR10 – PS présentent un indice de CI de – 0,07. Les souches résistantes à la MOX se comportent mieux. Ainsi, les MOX4R + PS atteignent un indice de CI de 0,4 au bout de 2 heures et 30 minutes. Dans le cas où la pression de sélection est supprimée (MOX4R – PS) les individus retrouvent un comportement comparable à la souche sauvage N2B ; on note un indice de CI de 0,8 au bout de 2 heures 30 minutes pour les MOX4R – PS en comparaison à un indice de CI de 0,8 pour la souche sauvage N2B.

Ces résultats nous permettent de conclure que les souches résistantes ont un défaut de reconnaissance de la nourriture. Cependant, les souches sélectionnées sur la MOX semblent palier ce défaut au bout de 2h et 30 minutes. La levée de la pression de sélection n'a pas d'effet sur les souches résistantes à l'IVM, tandis que chez les souches résistantes à la MOX, la suppression de la pression de sélection permet aux individus de retrouver un comportement comparable à la souche sauvage N2B.

4. Evaluation de la tolérance au stress oxydatif chez *C. elegans*.

Afin de déterminer le coup adaptatif de l'acquisition de tolérance aux LMs chez *C. elegans*, la tolérance au stress oxydatif par le paraquat dichloride, un herbicide qui entraine la formation d'epèces réactives de l'oxygènes, est évaluée chez les souches résistantes aux LMs en comparaison à la souche sauvage N2B (figure 11).

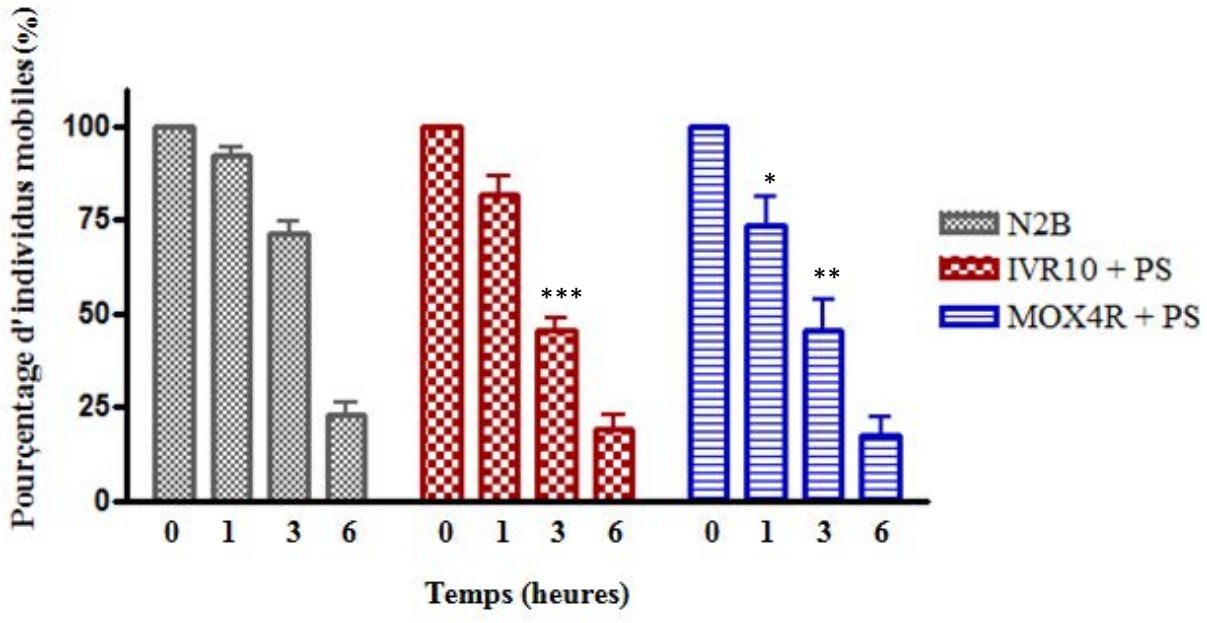


Figure 11 : Influence du paraquat dichloride sur la mobilité des souches résistantes. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 essais indépendant (13 réplicats) pour environ 20 vers par condition. Moyenne ± SEM. Test ANOVA 2 : *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001 pour chaque souche vis-à-vis de la souche sauvage N2B à un temps donné.

Les résultats montrent qu'après 1 heure d'exposition 94% des individus de la souche N2B sont encore mobiles tandis qu'après 6 heures d'exposition il ne reste que 7% d'individus mobiles. Chez la souche IVR10 + PS sélectionnée sur l'IVM, 85 % des individus sont mobiles après 1 heures d'exposition pour atteindre 16 % d'individus mobiles après 6 heures. La même cinétique s'observe pour les deux souches résistantes IVR10 et MOX4R avec une diminution progressive du nombre d'individus mobiles en fonction du temps d'exposition au paraquat dichloride.Ainsi, ces résultats suggèrent un effet toxique croissant au court du temps du paraquat dichloride sur les trois souches étudiées. On note une différence significative entre la souche sauvage N2B à 1 h d'exposition avec la souche MOX4R et à 3 h d'exposition avec la souche IVR10 et MOX4R. Les souches résistantes sont plus rapidement sensibles au paraquat que la souche sauvage. De ce fait, la souche sauvage N2B et les deux souches résistantes ne répondent pas de la même façon à une exposition au paraquat dichloride.

Le paraquat dichloride est une molécule connue pour induire un stress oxidant du à un déséquilibre entre la production et la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Une diminution du nombre d'individus mobiles est observée pour chaque souche. De plus, les souches résistantes sont plus rapidement impactées par l'action du paraquat dichloride. Cela suggère un coût adaptatif lié à l'acquisition de tolérance aux LMs vis-à-vis du paraquat dichloride.

5. Evaluation de la tolérance au stress salin chez *C. elegans*.

Afin de déterminer le coup adaptatif de l'acquisition de tolérance aux LMs chez *C. elegans*, la tolérance au stress salin est évaluée chez les souches résistantes aux LMs en comparaison à la souche sauvage N2B. Pour ce faire, environ 20 individus sont déposés sur une boite de gélose NGM complémentée à 500 mM de NaCl. La mobilité des individus est évaluée immédiatement après le dépôt et au bout de 3, 5, 7, 9 et 11 minutes (figure 12).

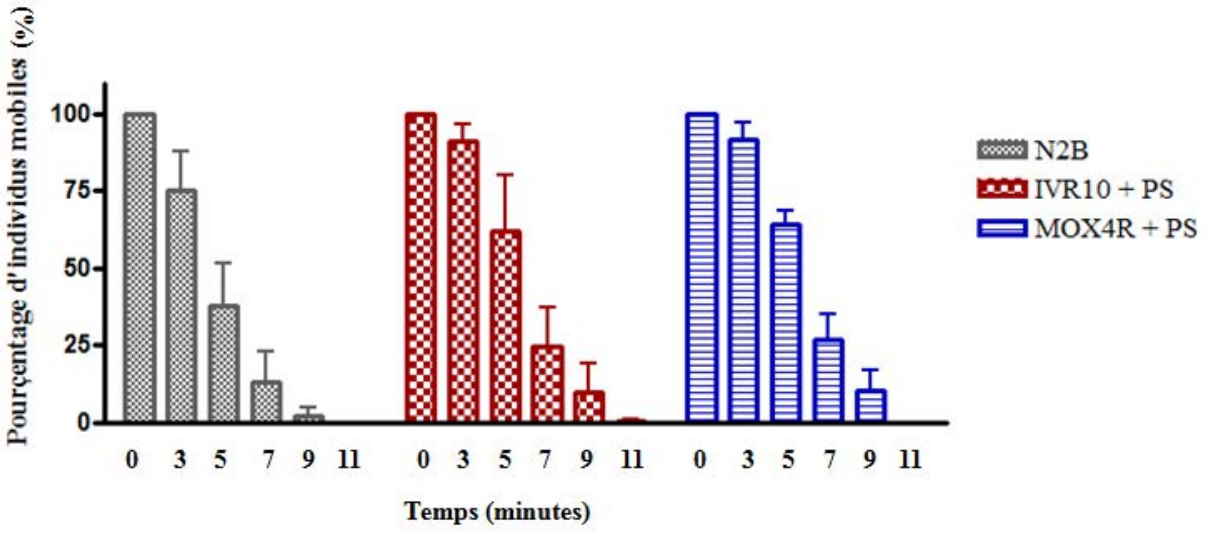


Figure 12 : Influence du stres osmotique sur la mobilité . Les valeurs ont été obtenues à partir de 4 essais indépendant pour environ 20 vers par condition. Moyenne ± SEM. Test ANOVA 2.

Les résultats montrent que le pourçentage d'individus mobiles atteint 75 % après 3 minutes d'exposition puis 2 % après 9 minutes pour la souche sauvage N2B. Globalement, la même cinétique est observée pour les 3 souches. Ces résultats suggèrent un effet toxique croissant au court du temps du NaCl. Bien que l'on note un pourçentage d'individus mobiles plus important chez les souches résistantes à chaque temps (après 9 minutes d'exposition le pourçentage d'individus mobiles est de 2 % pour la souche sauvage N2B et de 10% pour les souches IVR10 et MOX4R) les valeurs ne sont pas significativement différentes. Les souches résistantes aux LMs présentent la même sensibilité au NaCl que la souche sauvage N2B. De plus, la sensibilité aux NaCl n'est pas drogue-dépendante ; les deux souches résistantes répondent de la même façon.

Ainsi le phénotype résistant aux LMs n'impacte pas la gestion du stress osmotique.

6. Evaluation de la tolérance au stress thermique chez *C. elegans*.

Afin de déterminer le coup adaptatif de l'acquisition de tolérance aux LMs chez *C. elegans*, la tolérance au stress thermique est évaluée chez les souches résistantes aux LMs en comparaison à la souche sauvage N2B. Environ 20 individus sont déposés sur boite NGM classique et incubés à 37 ° C pendant 6 heures. La survie est comptabilisée immédiatement et au bout de 2, 3 et 6 heures d'exposition (figure 13).

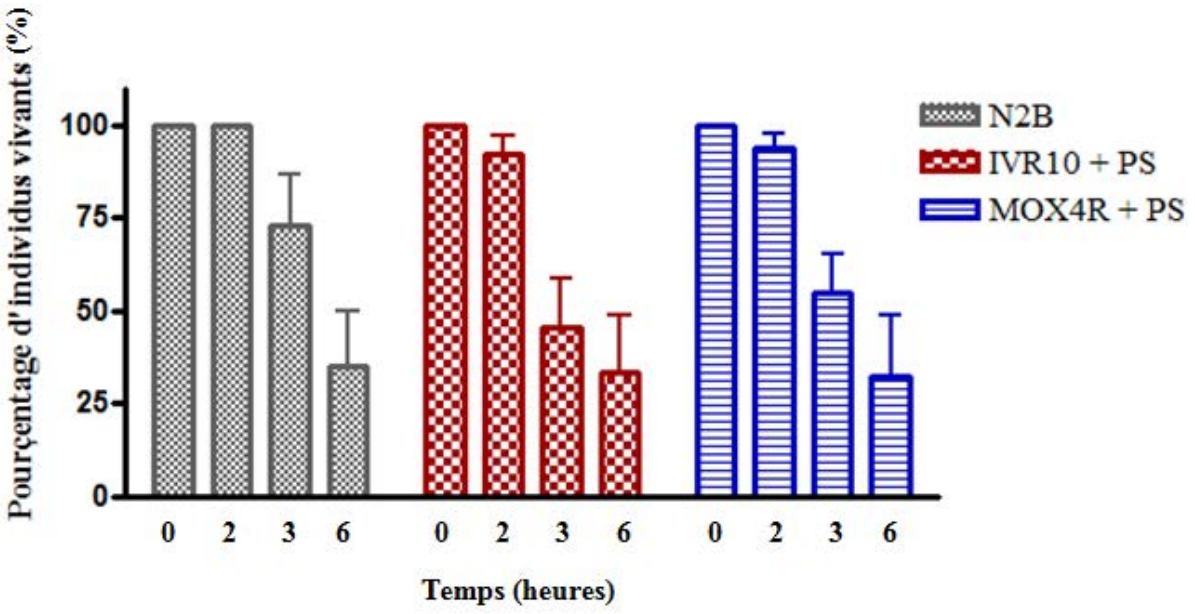
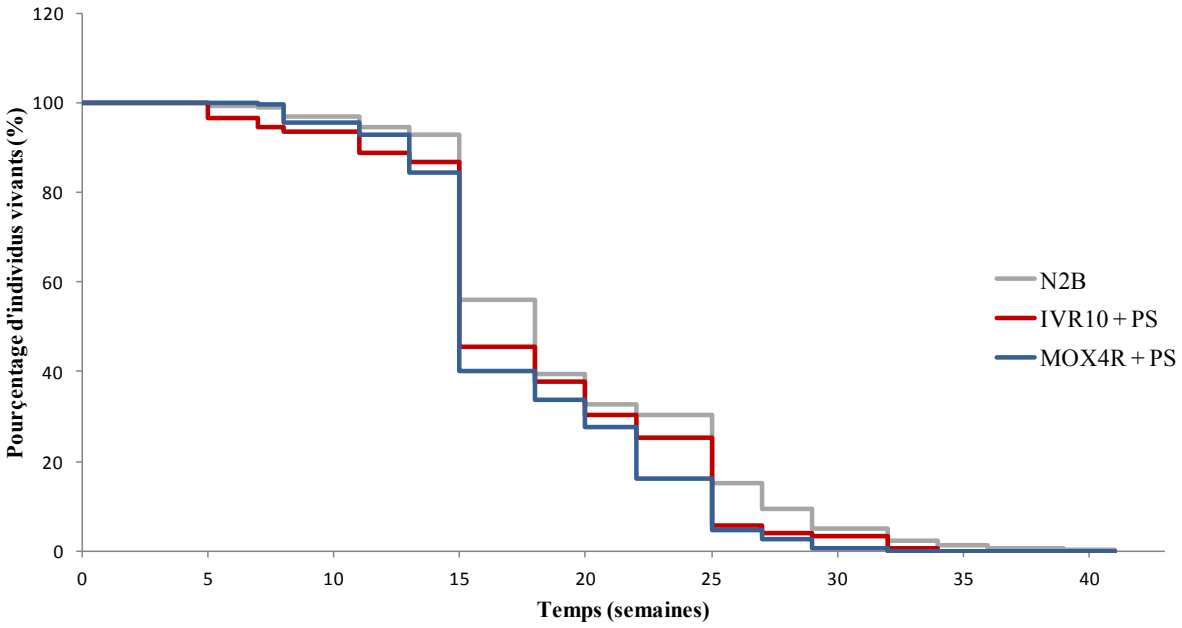


Figure 13 : Influence de la température sur la survie. Les valeurs ont été obtenues à partir de 2 essais indépendants (6 réplicats) pour environ 20 vers par condition. Moyenne ± SEM. Test ANOVA 2.

A l'issue de l'exposition à la température, on observe une diminution du nombre d'individus vivants au cours du temps pour toute les souches. On note un pourçentage de survivants de 100 % pour les N2B après 2 heures puis de 35 % après 6 heures d'exposition. On note donc un effet du temps sur la sensibilitée des 3 souches de *C. elegans* à une température de 37 °C. Globalement la cinétique est similaire pour les trois souches bien que lors de l'observation microscopique on note une sensibilité légérement plus importante pour les souches résistantes. En effet après 3 heures d'exposition, 73% des individus N2B sont vivants contre 50% pour les IVR10 et 55% pour les MOX4R. Le phénotype de résistance aux LMs n'impacte pas la gestion du stress thermique.

7. Evaluation de la longévité chez *C. elegans*.

Afin d'étudier l'effet de l'acquisition de la résistance sur la durée de vie de *C. elegans*, des individus des souches résistantes IVR10 et MOX4R et de la souche N2B sont placés en milieu liquide sans drogue. La longévité est déterminée par le comptage des individus vivants pendant une période de 40 jours (figure 14).



Longévité (jours)		
	Moyenne	Maximale
N2B	16	40
IVR10 + PS	14	34
MOX4R + PS	14	32

Figure 14 : Effet de la résistance à l'IVM et à la MOX sur la longévité de *C. elegans*. Les valeurs représentent le pourçentage de survie de la souche N2B, IVR10 + PS et MOX4 + PS avec environ 20 individus par condition.

La souche N2B a une longévité moyenne (50 % de vers vivants) de 16 jours et une longévité maximale (0 % de vers vivants) de 40 jours. Les souches résistantes présentent une longévité moyenne de 14 jours pour une longévité maximale de 34 jours pour les IVR10 + PS et 32 jours pour les MOX4R + PS. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons détecté aucune différence de longévité moyenne entre la souche sauvage N2B et les souches résistantes aux LMs. Cependant on note une longévité maximale plus faible pour les souches résistantes. En effet, on observe à partir de 25 jours une séparation entre les trois courbes et notamment pour la courbe réprésentant la souche MOX4R en comparaison à la souche sauvage N2B.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'acquisition d'une tolérance aux LMs réduit la longévité chez *C. elegans*.

IV. DISCUSSION

L'IVM et la MOX présentent des diminutions d'efficacité due à une résistance développée par les nématodes parasites vis-à-vis de ces anthelminthiques (*Lespine & al, 2012*). Le défi face à cette situation est de limiter le développement de résistance et de trouver des moyens pour cibler les vers résistants. Le développement de la résistance aux LMs pourrait s'accompagner d'autres changements collatéraux associés à un coût pour l'organisme pathogène. En effet, des études suggèrent que des individus ayant acquis une résistance ont une valeur sélective ou « fitness » diminuée par rapport à l'individu sauvage. Pour cela, il faut d'une part identifier si une réversion de la résistance est possible et d'autre part identifier les phénomènes collatéraux associés à cette résistance. C'est dans ce contexte que se place notre étude. Une potentielle réversion de la résistance a été étudié chez des souches de *C. elegans* résistantes à l'IVM et à la MOX. Pour cela, les vers résistants sont cultivés sans pression de sélection aux anthelminthiques pour évaluer l'évolution du phénotype de résistance. Par ailleurs, les modifications phénotypiques associées au phénotype résistant sont étudiées pour déterminer le coût associé à la résistance.

Dans un premier temps, le potentiel de réversion du phénotype résistant des souches sélectionnées à l'IVM et à la MOX a été étudié. Une augmentation de la sensibilité aux LMs est observée chez *C. elegans* résistant lorsque la pression de sélection est levée pendant 16 semaines, suggérant qu'une réversion partielle de la résistance aux LMs est possible lorsque le vers n'est plus exposé aux médicaments. Cependant *James and Davey (2009)* a montré un maintien de la résistance chez des souches de *C. elegans* résistantes à l'IVM, 3 mois après l'arrêt du traitement. Toutefois, une autre technique de mesure de l'efficacité des LMs a été utilisée pouvant expliquer la différence entre les résultats des auteurs et les résultats obtenus dans notre étude. Afin de conforter nos résultats, un test de développement larvaire devrait être effectué sur les souches IVR10 et MOX4R après une période plus importante sans pression de sélection afin de déterminer si l'efficacité des LMs est totalement restaurée ou bien si la résistance est partiellement ou totalement maintenue sans pression de sélection aux LMs.

Un lien entre le phénotype de déficience de marquage des amphides, associé à une mutation sur un gène impliqué dans le développement de ces structures (*dyf-7*), et la résistance à l'IVM a été montré par *Urdaneta & al* (2014) chez *C. elegans* et chez le nématode parasite *H. contortus*. Ce phénotype de déficience de marquage des neurones amphidiens a également été associé à la résistance à la MOX (*Ménez & al, 2016*). Dans notre

étude, la souche sauvage présente bien un phénotype normal des structures amphidiennes tandis que les souches résistantes à l'IVM et à la MOX montrent un phénotype déficient, avec une absence de fluorescence pour les amphides, en accord avec la littérature (*Urdaneta & al, 2014*). Cependant, dans la population de vers résistants à l'IVM quelques rares individus ont les deux amphides intègres visibles. Lors de la levée de la pression de sélection pendant 16 semaines chez les souches résistantes à l'IVM, un retour partiel au phénotype sauvage vis-à-vis des structures neuronales est obtenu, qui n'était pas observé après 8 semaines sans pression de sélection, suggèrant un retour possible à un phénotype sauvage vis-à-vis des structures amphidiennes en parallèle avec l'augmentation d'efficacité de l'IVM. En effet, la présence des quelques individus à phénotypes sauvages dans la population permettrait un brassage génétique et un retour au phénotype sauvage lorsque la pression de sélection à l'IVM est enlevée. Les quelques individus résistants à l'IVM et possèdant l'un des deux amphides seraient intéressant à étudier. Par ailleurs, les souches résistantes à la MOX restent déficientes en structures neuronales bien après la levée de la pression de sélection (18 semaines) en accord avec le phénotype 100 % déficient en amphide : il ne reste aucun individu parental dans la population de vers sélectionnée à la MOX. Ceci peut s'expliquer en partie par l'efficacité plus importante de la MOX vis-à-vis des vers résistants (*Ménez & al, 2016)*. De plus, il est connu que la MOX est une molécule ayant une affinité plus faible que l'IVM pour les P-glycoprotéines. Ces P-gp sont impliquées dans la résistance du fait de leurs fonction de transporteur qui exporte le médicament hors de la cellule limitant ainsi son action. La MOX étant un substrat de moinde affinité, celle-ci serait alors moins excrétée hors des cellules en accord avec une meilleure action anthelminthique sur les vers sans amphides, comparée à l'IVM. Pour approndir ces résultats, la recherche de mutation sur le gène *dyf-7* pourrait être effectuée sur les souches pour lesquelles la pression de sélection a été levée. En effet, une mutation sur ce gène est associée à une résistance à l'IVM et il serait intéressant de vérifier si cette mutation est toujours présente chez les souches résistantes sans pression de sélection.

Les organes chimiosensoriels que sont les amphides sont impliqués dans la reconnaissance du milieu. Ils permettent au nématode de détecter une gamme très large de molécules inorganiques et organiques ainsi que des substances odorantes volatiles tels que des produits du métabolisme des bactéries, source de nourriture pour *C. elegans*. Ces organes contrôlent des comportements tels que l'attraction vers les nurtiments où l'évitement d'un environnement toxique (*Pujol and Ewbank, 2003*). Ces structures sont donc nécessaires à la survie de l'organisme et un défaut implique une modification dans la reconnaissance de

l'environnement par le nématode et de la détection de la nourriture. La capacité de *C. elegans* à trouver la nourriture a été étudiée chez des souches résistantes et chez des souches pour lesquelles la pression de sélection aux LMs a été supprimée. Pour cela, un test de chimiotactisme vis-à-vis de la nourriture a été developpé. Cette approche a révélé un défaut de reconnaissance de la nourriture chez les souches résistantes aux LMs. Par contre, un retour au comportement sauvage vis-à-vis de la recherche de nourriture est observé pour les souches résistantes à la MOX après 10 semaines sans pression de sélection. Il est intéressant de noter que ces souches sont déficientes en structures amphidiennes. L'ensemble de ces résultats implique qu'une déficience dans les structures neuronales n'est pas obligatoirement liée à un défaut de reconnaissance de la nourriture dans nos conditions expérimentales. Ainsi, bien que les amphides sont d'importants organes chimiosensoriels, sur la base de nos résultats ce ne sont vraissemblablement pas les seuls impliqués dans la reconnaissance de la nourriture (*Perry, 1993*). Cependant, il est important de mentionner que les tests de détection de nourriture ont été réalisés plusieurs semaines avant les tests de marquage des neurones des amphides. Cela pourrait expliquer le décalage entre les phénotypes « intégrité des amphides » et « reconnaissance de nourriture ». Pour vérifier ce point, les tests de détection de nourriture devrait être réalisés en même temps que les tests de marquage des neurones des amphides.

Zhou & al (2011) suggèrent que des individus soumis à un stress modéré présentent une augmentation de la longévité et de la résistance à d'autres stress tels que le stress oxidatif et le stress thermique. Le phénomène d'hormèse est l'induction d'effet bénéfique par une exposition à faible dose d'agent chimique. On peut ainsi envisager que l'exposition aux LMs chez *C. elegans* provoquerait des effets hormétique sur l'organisme. La tolérance au stress oxydatif par le paraquat, au stress thermique à 37 °C et au stress osmotique à 500 mM de NaCl a été étudiée sur les souches résistantes aux LMs en comparaison à la souche sauvage. Une diminution de la tolérance à un stress oxydatif par le paraquat dichloride est observée chez les souches résistantes à l'IVM et à la MOX. Ceci suggère que chez les souches résistantes, la pression de sélection aux LMs n'induit pas d'effet hormétique mais plutôt une diminution de la valeur sélective de l'individu dans nos conditions expérimentales. Dans le cas des autres stress, aucune différence de tolérance n'a été observée pour les souches résistantes. Celles-ci répondent aux différents stress de la même manière que la souche sauvage N2B avec un effet similaire de la température et du stress osmotique sur la mobilité et la mortalité. *Cypser and Johnson* (2002) ont montré chez *C. elegans* une augmentation de la tolérance à la température et au stress oxydatif suite à une pré-sensibilisation à ces conditions. *Menez & al* (2016) a également montré une tolérance croisée à l'eprinomectine

chez des souches de *C. elegans* rendues résistantes à l'IVM ou à la MOX. Par contre, *Cypser and Johnson* (2002) n'ont pas montré d'effet hormétique suite à un stress au UV, et *Menez & al* (2016) a observé une augmentation de la sensibilité à d'autres anthelminthiques et drogues tels que le levamisole, le sulfoxide, la chloroquine et la colchicine chez des souches de *C. elegans* résistantes à l'IVM et à la MOX. De plus, l'étude a mis en évidence une longévité diminuée chez les souches résistantes aux LMs vis-à-vis de la souche sauvage N2B. Ceci est en accord avec l'absence d'augmentation de la tolérance à différents stress chez les souches résistantes. Nos résultats sont en accord avec l'étude de *Zhou & al (2011*) qui a montré une augmentation de la longévité en lien avec une augmentation de la tolérance à différents stress chez *C. elegans*.

Cette étude amène de nouvelles informations sur les mécanismes mis en place lors de la résistance aux LMs et sa réversion chez le nématode *C. elegans*. Nous avons pu mettre en évidence un retour partiel à la sensibilité à l'IVM et à la MOX chez des souches de *C. elegans* résistantes à ces LMs. De plus, nous avons montré que pour certains stress (stress oxidant), les individus résistants sont plus sensibles que la souche sauvage, suggèrant un coût sur la valeur sélective de l'individu associé à la résistance aux LMs. En ce qui concerne les autres stress, aucun coût n'est associé à la résistance dans les conditions testées. Un lien entre la résistance aux LMs et un défaut de chimiotactisme vis-à-vis de la nourriture a clairement été établi. Ce phénotype est réversible chez les vers sélectionnés sur la MOX mais pas dans le cas des vers sélectionnés à l'IVM après 10 semaines sans pression de sélection. Par contre, aucun lien entre le chimiotactisme vis-à-vis de la nourriture et l'intégrité des structures neuronales des amphides n'a pu être établi. Nos résultats suggèrent que la réversion de la tolérance à l'IVM et à la MOX est possible. Les cinétiques de réversion aux deux LMs sont similaires. Il existe cependant des différences de phénotypes entre les deux lignées. Les différents tests phénotypiques mis en place pour cette étude ont apportés une meilleure connaissance des souches de *C. elegans* résistantes aux LMs. L'ensemble de ces résultats a également mis en évidence des différences de mécanismes de résistance entre l'IVM et la MOX. De plus, la similarité des résultats obtenus avec ceux observés chez les nématodes parasites suggèrent que *C. elegans* est un modèle d'étude pertinent pour la recherche de mécanismes de résistance aux LMs chez les nématodes. Ces résultats contribueront à découvrir des cibles pertinentes pour réverser la résistance aux LMs ou ralentir son développement.

BIBLIOGRAPHIE

ASSANA E., KYNGDON C-T., GAUCI C-G., GEERTS S., DORNY P., DE DEKEN R., ANDERSON G-A., ZOLI A-P., LIGHTOWLERS M-W. 2010. Eliminatino of *Taenia solium* transmission to pig in a field trial of the TSOL18 vaccine in Cameroon. *International Journal for Parasitology*. 40 : 515-519.

AWADZI K., OPOKU N-O., ATTAH S-K., LAZDINS-HELDS J., KUESEL A-C. 2014. A randomized, single-ascending-dose, ivermectin – controlled, double-blind study of moxidectin in *Onchocerca volvulus* infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.8 : e2953.

BLACKHALL W.J., POULIOT J.-F., PRICHARD R.K., BEECH R.N. 1998. *Haemonchus contortus*: selection at glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin and moxidectin-selected strains. *Experimental Parasitology*. 90 : 42-48

BRENNER S. 1974. The genetics of *Caernorhabditis elegans*. *Genetics*. 77 : 71 – 94.

COUILLAULT C., KURZ C-L. 2010. Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire. STAL, 36.

CURRIE B-J., HARUMAL P., McKINNON M., WALTON S-F. 2004. First documentation of *in vivo* and *in vitro* ivermectin resistance in *Sarcoptes scabiei*. Clinical Infectious Diseases 39 : 8-12.

CYPSER J-R, JOHNSON T-E. 2002. Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *Journal of Gerontology : BIOLOGICAL SCIENCES*. Vol57A, No3, B109-B114.

DE GRAEF J., DEMELER J., SKUCE P., MITREVA M., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G., VERCRUYSSE J., CLAEREBOUT E., GELDHOF P. 2012. Gene expression analysis of ABC transporters in a resistant *Cooperia oncophora* isolate following *in vivo* and *in vitro* exposure to macrocyclic lactones. *Parasitology*. 1-10.

DEMELER J., KRUCKEN J., ALGUSBI S., RAMUNKE S., DE GREAF J., KERBOEUF D., GELDHOF P., POMROY W-E., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. 2013. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia onchopora*. *Molecular and biochemical parasitology*. 188 : 10-19.

GEARY T-G., WOO K., McCARTHY J-S., MACKENZIE C-D., HORTON J., PRICHARD R-K., de SILVA N-R., OLLIARO P-L., LAZDINS-HELDS J-K., ENGELS D-A.,

BUNDY D-A. 2010. Unresolved issues in anthelmintic pharmacology for helminthiases of humans. *International Journal for Parasitology*. 40 : 1-13.

GEURDEN T., CHARTIER C., FANKE J., DI REGALBONO A-F., TRAVERSA D., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G., DEMELER J., VANIMISETTI H-B., BARTRAM D-J., DENWOOD M-J. 2015. Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *International Journal for Parasitology. Drugs and drug resistance*. 5 : 163- 171.

HOLDEN-DYE L., WALKER R-J. Anthelmintic drugs and nematicides : studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 2014 [en ligne]. Disponible sur http://www.wormbook.org (consulté le 31/05/2016).

JAMES C-E., DAVEY M-W. 2009. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*. 39 : 213-220.

JANSSEN I-J-I., KRUCKEN J., DEMELER J., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. 2013. *Caenorhabditis elegans* : modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains. *Experimental Parasitology.*134 : 171-177.

LESPINE A., MARTIN S., DUPUY J., ROULET A., PINEAU T., ORLOWSKI S., ALVINERIE M. 2007. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 30 : 84 - 94

LESPINE A., MENEZ C.,BOURGUINAT C., K.PRICHARD R. 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharamacology of anthelmintics : Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Drug for Parsitology : Drugs and Drug Resistance.* 2 : 58-75.

LIONAKI E., TAVERNARAKIS N. 2013. High-Throughput and Longitudinal Analysis of Aging and Senescent Decline in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Senescence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 965.

McKELLAR Q-A., GOKBULUT C. 2012. Pharmacokinetic Features of the antiparasitic macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology*. 13 : 888-911.

MENEZ C., SUTRA J-F., PRICHARD R., LESPINE A. 2012. Relative neurotoxicity of Ivermectin and Moxidectin in Mdr1ab (-/-) Mice and effects on mammalian GABA(A) channel activity. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 6, 11.

MENEZ C., ALBERICH M., KANSOH D., BLANCHARD A., LESPINE A. 2016. Acquired tolerance to ivermectin and moxidectin after drug selection pressure in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy. In Press*.

NJUE A-I., HAYASHI J., KINNE L., FENG X-P., PRICHARD R-K. 2004. Mutation in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel α3 and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *Journal of Neurochemistry*. 89 : 1137-1147.

OSEI-ATWENEBOANA M-Y., ENG J-KL., BOAKYE D-A., GYAPONG J-O., PRICHARD R-K. Prevalence and intensity of *Onchorceca volvulus* infection and efficacity of ivermectin in endemic communities in Ghana: a two-phase epidemiological study. The Lancet, 2007, Volume 369, Issue 9578, 2021-2029.

PERRY R-N. 1993. Studies on nematode sensory perception as a basis for novel control strategies. Fundamental and Applied Nemtology. 17 (3) : 199 -202.

PRICHARD R., MENEZ C., LESPINE A. 2012. Moxidectin and the avermectins : consanguinity but not identity. *International Drug for Parsitology : Drugs and Drug Resistance*. 2 : 134-153.

PUJOL N., EWBANK J-J. 2003. Une vie de ver. *Medecine Sciences*. 19 : 1209-17.

SARGISON N-D., JACKSON F., BARTLEY D-J., WILSON D-J., STENHOUSE L-J., PENNY C-D. 2007. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in south-east of Scotland. Veterinary parasitology. 145, 65.

SHALLIG H-D. 2000. Immunlogical responses of sheep to Haemonchus *contortus. Parasitology*. 120 : 63-72.

SHOOP L-W., MROZIK H., FISHER M-H. 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary parasitology*. 59 : 139-156.

Simon Fraser University – Department of biological sciences. What is *C. elegans* ? [en ligne]. Disponible sur http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Celegans.html (consulté le 04.02.2016).

The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans* : a platform for investigating biology. *Science*, 1998, 282 (5396).

URDANETA-MARQUEZ L., HANG BAE S., JANUKAVICIUS P., BEECH R., DENT J., PRICHARD R. 2014. A *dyf*-7 haplotype causes sensory neuron defects and is associated with macrocyclic lactone resistance worldwide in the nematode parasite *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 44 : 1063–1071.

Van WYK., MALAN J-A., MALAN F-S. 1988. Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxine, and the benzimidazoles in South Africa. *The Veterinary Record*. 123, 226. ZHOU K-I., PINCUS Z., SLACK F-J. Longevity and stress in *Caernohabditis elegans*. *AGING*, 2011, Vol3, No8.

ZENG Z., ANDREW N-W., ARISON B-H., LUFFER-ATLAS D., WANG R-H. 1998. Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectine by human liver microsomes. *Xenobiotica*. 28, 313.

ZHOU K-I., PINCUS Z., SLACK F-J. 2011. Longevity and stress in *Caenorhabditis elegans. AGING.* Vol 3. No8.

ANNEXES A

Tableau récapitulatif de l'ensemble des résultats obtenus pour chaque souche.

Souche	N2B	IVR10		MOX4R	
Pression de sélection aux LMs	-	+	-	+	-
EC50 / IVM (nM)	1,7	9,2	5,7	9,3	7,8
EC50 / MOX (nM)	1,8	2,1	1,9	4,6	3,3
Ratio – PS / + PS IVM		0,6		0,8	
Ratio – PS/ + PS MOX		0,9		0,7	
Dye filling	+	-	+	-	-
Chiomiotactisme (CI) (2h30)	0,8	-0,4	-0,07	0,4	0,8
Tolérance température		= N2B		= N2B	
Tolérance NaCl		= N2B		= N2B	
Tolérance paraquat		+ sensible		+ sensible	
Longévité (jours)	40	34		32	

CONVENTION

ANNEXE

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Année universitaire : 2015/2016

Convention de stage entre

Nota : pour faciliter la lecture du document, les mots « stagiaire », « enseignant référent », « tuteur de stage », « représentant légal », « étudiant » sont utilisés au masculin

1 - L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT OU DE FORMATION

Nom : Université de Lorraine

Adresse : 34 Cours Léopold – CS 25233 – 54052 NANCY Cédex ,

Siret n°130 015 506 00012, représenté par son Président, Monsieur Pierre Mutzenhardt

☎ .....

Représenté par (signataire de la convention) : Monsieur Stéphane FLAMENT

Qualité du représentant : Doyen de l'UFR Faculté des Sciences et Technologies

Composante/UFR ... : Faculté des Sciences et Technologies

☎

mél : Stephane.Flament@univ-lorraine.fr

Adresse (si différente de celle de l'établissement) : Master BioMANE – Secteur Biologie – Campus Aiguillettes – BP 70239 – 54506 Vandoeuvre les Nancy cédex

2 - *L'ORGANISME D'ACCUEIL*

Nom : INRA Centre de recherche de Toulouse

Adresse : 24 chemin de Borde-Rouge – Auzeville – CS 52627 – 31326 Castanet –Tolosan Cedex

Représenté par :

Michèle MARIN

Qualité du représentant: Présidente de Centre de Toulouse

Signataire de la convention : Bernard SALES - Directeur de l'Unité 1331 Toxalim

Service dans lequel le stage sera effectué : UMR 1331 – Team 6 – « Membrane Transporters and Resistance »

☎ +33582066334

mél :cecile.menez@toulouse.inra.fr

Lieu du stage (si différent de l'adresse de l'organisme) : UMR 1331 Toxalim 180 chemin de Tournefeuille – BP 93173 – 31027 Toulouse Cedex 3

3 - LE STAGIAIRE

Nom : GOULON Prénom : Amandine Sexe : F ■ M ☐ Né(e) le : 14 /08/1992

Adresse : 3 place du poirier du chat 57640 VIGY

☎ 0679124850 . mél : goulon.amandine@orange.fr

INTITULE DE LA FORMATION OU DU CURSUS SUIVI DANS L'ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET VOLUME HORAIRE (ANNUEL OU SEMESTRIEL) : MASTER BIOTECHNOLOGIES MICROBIOLOGIES ALIMENT NUTRITION ENVIRONNEMENT (BIOMANE)

SUJET DE STAGE ETUDE DE LA REVERSION DE RESISTANCE AUX MEDICAMENTS ANTHELMINTHIQUES CHEZ LE NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Dates : Du 18/01/ 2016 Au 18/07/ 2016

Représentant une **durée totale** de 6 (Nombre de Semaines / de Mois (rayer la mention inutile)

Et correspondant à . Jours de présence effective dans l'organisme d'accueil.

Répartition si présence discontinue : 35 nombre d'heures par semaine ou ~~nombre d'heures par jour~~ (rayer la mention inutile).

Commentaire : .....

ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT

Nom et prénom de l'enseignant référent: LEBLOND-BOURGET Nathalie

Fonction (ou discipline) : Directeur du Master BioMANE

☎ 03 83 68 42 10 mél : nathalie.leblond@univ-lorraine.fr

ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ORGANISME D'ACCUEIL

Nom et prénom du tuteur de stage : MENEZ Cécile

Fonction : Chercheur à l'INRA

☎+33582066334 mél : cecile.menez@toulouse.inra.fr

Caisse primaire d'assurance maladie à contacter en cas d'accident (lieu de domicile du stagiaire sauf exception) : MGEL

Page 1

Article 1 – Objet de la convention
La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'établissement d'enseignement et le stagiaire.

Article 2 – Objectif du stage
Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle l'étudiant(e) acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue de l'obtention d'un diplôme ou d'une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.
Le programme est établi par l'établissement d'enseignement et l'organisme d'accueil en fonction du programme général de la formation dispensée.
ACTIVITES CONFIEES : L'étudiant cultivera les différentes souches de nématode de laboratoire *Caenorhabditis elegans* (sensibles et résistante à l'ivermectine ou à la moxidectine) selon les protocoles utilisés dans le laboratoire. Les vers seront exposés à des concentrations croissantes de médicaments et différents tests phénotypiques seront effectués : étude du développement larvaire pour quantifier l'efficacité des médicaments, étude de la capacité du vers à s'alimenter, étude du maquage des neurones de amphides au cours du temps aux différentes stades de développement. Des tests transcriptomiques pourront également être réalisés en évaluant l'expresion des gènes codant pour les systèmes de détoxification.
COMPETENCES A ACQUERIR OU A DEVELOPPER :
Culture de *C. elegans*, microbiologie, microscopie, extraction d'ARN, qRT-PCR.

Article 3 – Modalités du stage
La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans l'organisme d'accueil sera de 35 heures sur la base d'un temps complet/ ~~temps partiel~~ *(rayer la mention inutile)*,

Si le stagiaire doit être présent dans l'organisme d'accueil la nuit, le dimanche ou un jour férié, préciser les cas particuliers : NON
.....

Article 4 – Accueil et encadrement du stagiaire
Le stagiaire est suivi par l'enseignant référent désigné dans la présente convention ainsi que par le service de l'établissement en charge des stages.
Le tuteur de stage désigné par l'organisme d'accueil dans la présente convention est chargé d'assurer le suivi du stagiaire et d'optimiser les conditions de réalisation du stage conformément aux stipulations pédagogiques définies.
Le stagiaire est autorisé à revenir dans son établissement d'enseignement pendant la durée du stage pour y suivre des cours demandés explicitement par le programme, ou pour participer à des réunions ; les dates sont portées à la connaissance de l'organisme d'accueil par l'établissement.
L'organisme d'accueil peut autoriser le stagiaire à se déplacer.
Toute difficulté survenue dans la réalisation et le déroulement du stage, qu'elle soit constatée par le stagiaire ou par le tuteur de stage, doit être portée à la connaissance de l'enseignant-référent et de l'établissement d'enseignement afin d'être résolue au plus vite.

MODALITES D'ENCADREMENT (visites, rendez-vous téléphoniques, etc)
.....
.....

Article 5 – Gratification - Avantages
En France, lorsque la durée du stage est supérieure à deux mois consécutifs ou non, celui-ci fait obligatoirement l'objet d'une gratification, sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises et pour les stages relevant de l'article L4381-1 du code de la santé publique.
Le montant horaire de la gratification est fixé à 13,75 % du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L.241-3 du code de la sécurité sociale. Une convention de branche ou un accord professionnel peut définir un montant supérieur à ce taux.
La gratification due par un organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme au cours de la période concernée.
La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés

(article 5 suite) En cas de suspension ou de résiliation de la présente convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratisé en fonction de la durée du stage effectué.
La durée donnant droit à gratification s'apprécie compte tenu de la présente convention et de ses avenants éventuels, ainsi que du nombre de jours de présence effective du/de la stagiaire dans l'organisme.

LE MONTANT DE LA GRATIFICATION est fixé à 554.40 € par ~~heure / jour~~ / mois *(rayer les mentions inutiles)*

Article 5 bis –Accès aux droits des salariés – Avantages (Organisme de droit privé en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :
Le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L.1121-1, L.1152-1 et L.1153-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.
Le stagiaire a accès au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurants prévus à l'article L.3262-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés de l'organisme d'accueil. Il bénéficie également de la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L.3261-2 du même code.
Le stagiaire accède aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L.2323-83 du code du travail dans les mêmes conditions que les salariés.
AUTRES AVANTAGES ACCORDES : .....
.....

Article 5ter – Accès aux droits des agents - Avantages (Organisme de droit public en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :
Les trajets effectués par le stagiaire d'un organisme de droit public entre leur domicile et leur lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret n°2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail.
Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur.
Est considéré comme sa résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.
AUTRES AVANTAGES ACCORDES : ...50% DU TRANSPORT EN COMMUN REMBOURSE.....

Article 6 – Régime de protection sociale
Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son régime de Sécurité sociale antérieur.
Les stages effectués à l'étranger sont signalés préalablement au départ du stagiaire à la Sécurité sociale lorsque celle-ci le demande.
Pour les stages à l'étranger, les dispositions suivantes sont applicables sous réserve de conformité avec la législation du pays d'accueil et de celle régissant le type d'organisme d'accueil.

6-1 Gratification d'un montant maximum de 13,75 % du plafond horaire de la sécurité sociale :
La gratification n'est pas soumise à cotisation sociale.
Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre du régime étudiant de l'article L.412-8 2° du code de la sécurité sociale.
En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours d'activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins du stage et pour les étudiants en médecine, en chirurgie dentaire ou en pharmacie qui n'ont pas un statut hospitalier pendant le stage effectué dans les conditions prévues au b du 2° de l'article L.418-2, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la Caisse Primaire d'Assurance Maladie ou la caisse compétente (voir adresse en page 1) en mentionnant l'établissement d'enseignement comme employeur, avec copie à l'établissement d'enseignement.

par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement et le transport.
L'organisme peut décider de verser une gratification pour les stages dont la durée est inférieure ou égale à deux mois.

6.2 – Gratification supérieure à 13,75 % du plafond horaire de la sécurité sociale :
Les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 13,75 % du plafond horaire de la Sécurité Sociale.
L'étudiant bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L.411-1 et suivants du code de la Sécurité Sociale. En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours des activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie et informe l'établissement dans les meilleurs délais.

6.3 – Protection Maladie du/de la stagiaire à l'étranger
1) Protection issue du régime étudiant français
- pour les stages au sein de l'Espace Economique Européen (EEE) effectués par des ressortissants d'un Etat de l'Union Européenne, ou de la Norvège, de l'Islande, du Liechtenstein ou de la Suisse, ou encore de tout autre Etat (dans ce dernier cas, cette disposition n'est pas applicable pour un stage au Danemark, Norvège, Islande, Liechtenstein ou Suisse), l'étudiant doit demander la Carte Européenne d'Assurance Maladie (CEAM).
- pour les stages effectués au Québec par les étudiant(e)s de nationalité française, l'étudiant doit demander le formulaire SE401Q (104 pour les stages en entreprises, 106 pour les stages en université) ;
- dans tous les autres cas les étudiants qui engagent des frais de santé peuvent être remboursés auprès de la mutuelle qui leur tient lieu de Caisse de Sécurité Sociale étudiante, au retour et sur présentation des justificatifs : le remboursement s'effectue alors sur la base des tarifs de soins français. Des écarts importants peuvent exister entre les frais engagés et les tarifs français base du remboursement. Il est donc fortement conseillé aux étudiants de souscrire une assurance Maladie complémentaire spécifique, valable pour le pays et la durée du stage, auprès de l'organisme d'assurance de son choix (mutuelle étudiante, mutuelle des parents, compagnie privée ad hoc...) ou, éventuellement et après vérification de l'étendue des garanties proposées, auprès de l'organisme d'accueil si celui-ci fournit au stagiaire une couverture Maladie en vertu du droit local (voir 2e ci-dessous).
2) Protection sociale issue de l'organisme d'accueil
En cochant la case appropriée, l'organisme d'accueil indique ci-après s'il fournit une protection Maladie au stagiaire, en vertu du droit local :
☐ OUI : cette protection s'ajoute au maintien, à l'étranger, des droits issus du droit français
☐ NON : la protection découle alors exclusivement du maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français étudiant).
Si aucune case n'est cochée, le 6.3 – 1 s'applique.

6.4 Protection Accident du Travail du stagiaire à l'étranger
1) Pour pouvoir bénéficier de la législation française sur la couverture accident de travail, le présent stage doit :
- être d'une durée au plus égale à 6 mois, prolongations incluses ;
- ne donner lieu à aucune rémunération susceptible d'ouvrir des droits à une protection accident de travail dans le pays d'accueil ; une indemnité ou gratification est admise dans la limite de 13,75 % du plafond horaire de la sécurité sociale (cf point 5), et sous réserve de l'accord de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie sur la demande de maintien de droit ;
- se dérouler exclusivement dans l'organisme signataire de la présente convention ;
- se dérouler exclusivement dans le pays d'accueil étranger cité.
Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, l'organisme d'accueil s'engage à cotiser pour la protection du stagiaire et à faire les déclarations nécessaires en cas d'accident de travail.
2) La déclaration des accidents de travail incombe à l'établissement d'enseignement qui doit en être informé par l'organisme d'accueil par écrit dans un délai de 48 heures.
3) La couverture concerne les accidents survenus :
• dans l'enceinte du lieu du stage et aux heures du stage,

(6-4 suite)
• lors du premier trajet pour se rendre depuis son domicile sur le lieu de sa résidence durant le stage (déplacement à la date du début du stage),
• lors du dernier trajet de retour depuis sa résidence durant le stage à son domicile personnel.
4) Pour le cas où l'une seule des conditions prévues au point 6.4-1/ n'est pas remplie, l'organisme d'accueil s'engage à couvrir le/la stagiaire contre le risque d'accident de travail, de trajet et les maladies professionnelles et à en assurer toutes les déclarations nécessaires.
5) Dans tous les cas :
• si l'étudiant est victime d'un accident de travail durant le stage, l'organisme d'accueil doit impérativement signaler immédiatement cet accident à l'établissement d'enseignement ;
• si l'étudiant remplit des missions limitées en-dehors de l'organisme d'accueil ou en-dehors du pays du stage, l'organisme d'accueil doit prendre toutes les dispositions nécessaires pour lui fournir les assurances appropriées.

Article 7 – Responsabilité et assurance
L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garantis au titre de la responsabilité civile.
Pour les stages à l'étranger ou outremer, le stagiaire s'engage à souscrire un contrat d'assistance (rapatriement sanitaire, assistance juridique...) et un contrat d'assurance individuel accident.
Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un étudiant
Lorsque dans le cadre de son stage, l'étudiant utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule et, le cas échéant, s'acquitte de la prime y afférente.

Article 8 – Discipline
Le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil.
Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'établissement d'enseignement. Dans ce cas, l'organisme d'accueil informe l'enseignant référent et l'établissement des manquements et fournit éventuellement les éléments constitutifs.
En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions fixées à l'article 9 de la présente convention.

Article 9 – Congés – Interruption du stage
En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans les organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévues pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-46 du code du travail.
Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles.
NOMBRE DE JOURS DE CONGES AUTORISES / ou modalités des congés et autorisations d'absence durant le stage :
14.5.....
Pour toute autre interruption temporaire du stage (maladie, absence injustifiée...) l'organisme d'accueil avertit l'établissement d'enseignement par courrier.
Toute interruption du stage, est signalée aux autres parties à la convention et à l'enseignant référent. Une modalité de validation est mise en place le cas échéant par l'établissement. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage.

• sur le trajet aller-retour habituel entre la résidence du stagiaire sur le territoire étranger et le lieu du stage,
• dans le cadre d'une mission confiée par l'organisme d'accueil du stagiaire et obligatoirement par ordre de mission,

(Article 9 suite)
En cas de volonté d'une des trois parties (organisme d'accueil, stagiaire, établissement d'enseignement) d'arrêter le stage, celle-ci doit immédiatement en informer les deux autres parties par écrit. Les raisons invoquées seront examinées en étroite concertation. La décision définitive d'arrêt du stage ne sera prise qu'à l'issue de cette phase de concertation.

Article 10 – Devoir de réserve et confidentialité
Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues par eux pour en faire publication, communication à des tiers sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaut non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.
Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport de stage, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.
Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

Article 11 – Propriété intellectuelle
Conformément au code de la propriété intellectuelle, dans le cas où les activités du stagiaire donnent lieu à la création d'une œuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.
Le contrat devra alors notamment préciser l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

Un avenant à la convention pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale du stage fixée par la loi (6 mois).

Article 12 – Fin de stage – Rapport - Evaluation
1) Attestation de stage : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre une attestation dont le modèle figure en annexe, mentionnant au minimum la durée effective du stage et, le cas échéant, le montant de la gratification perçue. Le stagiaire devra produire cette attestation à l'appui de sa demande éventuelle d'ouverture de droits au régime général d'assurance vieillesse prévue à l'art. L.351-17 du code de la sécurité sociale ;
2) Qualité du stage : à l'issue du stage, les parties à la présente convention sont invitées à formuler une appréciation sur la qualité du stage.
Le stagiaire transmet au service compétent de l'établissement d'enseignement un document dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil. Ce document n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.
3) Evaluation de l'activité du stagiaire : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil renseigne une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'enseignant référent*(ou préciser si fiche annexe ou modalités d'évaluation préalablement définis en accord avec l'enseignant référent)*.....
4) Modalités d'évaluation pédagogiques : le stagiaire devra *(préciser la nature du travail à fournir –rapport, etc.- éventuellement en joignant une annexe)*.....
NOMBRE D'ECTS (le cas échéant) :
.....
.....
.....
5) Le tuteur de l'organisme d'accueil ou tout membre de l'organisme d'accueil appelé à se rendre dans l'établissement d'enseignement dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'établissement d'enseignement.

Article 13 – Droit applicable – Tribunaux compétents
La présente convention est régie exclusivement par le droit français.
Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

L'INRA, étant son propre assureur, ne couvre pas la responsabilité civile du stagiaire.

FAIT A ...TOULOUSE..... LE.....24/11/2015.....

POUR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT
Nom et signature du représentant de l'établissement
FLAMENT Stéphane
Doyen de l'UFR FST,
COLLEGIUM SCIENCES ET TECHNOLOGIES
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
Le Doyen,
S. FLAMENT

STAGIAIRE (ET SON REPRESENTANT LEGAL LE CAS ECHEANT)
Nom et signature
GOULON Amandine

POUR L'ORGANISME D'ACCUEIL
Nom et signature du représentant de l'organisme d'accue
Bernard SALES – Directeur de l'Unité 1331 Toxalim

Page

RÉSUMÉ

Les lactones macrocycliques (LMs) sont des médicaments antiparasitaires utilisés en médecine humaine et vétérinaire dont le succès thérapeutiques est compromis par l'apparition de résistance. Il est donc nécessaire de caractériser l'adaptation de nématode modèle, *C. elegans*, à une pression de sélection à l'IVM et à la MOX. La sensibilité aux LMs, aux stress oxidatif, thermique et osmotique ont été étudiés chez des souches résistantes pour lesquelles la pression de sélection a été levée. Les souches résistantes aux LMs ont un défaut de chimiotactisme vis-à vis de la nourriture et une sensibilité accrue au paraquat. Lorsque la pression de sélection a été levée, un retour partiel à la sensibilité vis-à-vis des deux LMs est obtenu sur les deux souches résistantes. Tandis que seules les souches résistantes à la MOX retrouvent la capacité à détecter la nourriture. Par ailleurs, les vers résistants aux LMs présentent une diminution de la longévité. Cette étude amène de nouvelles informations sur les mécanismes mis en place lors de la résistance aux LMs et sa réversion chez le nématode *C. elegans*.

Mots-clés : Résistance aux anthelminthiques - Lactones macrocycliques – *Caenorhabditis elegans* – réversion – « fitness » – amphides

Macrocyclic lactones are pharmaceutical drugs used in humans and animals health whose therapeutic success is compromised by the development of resistance. In that context, our objective was characterize the adaptation of the model nematode *C. elegans* to ML selection pressure. Sensitivities to MLs and to oxidative, thermal and osmotic stress were determined in ML-selected strains after the remove of selection pressure. ML-selected strains were defective in food chemotaxis and were more sensitive to paraquat. After the removal of MLs selection pressure in ML-selected strain, a reversion towards susceptibility for MLs was observed. Moreover, only MOX-selected strain was able to detect food when the drug selection pressure was absent. Otherwise, all the ML-selected strains have their lifespan decreased. This study provides new data about the mechanisms of resistance to MLs and reversion towards susceptibility in the nematode *C. elegans*.

Keywords : Anthelmintic resistance - Macrocyclic lactone – *Caenorhabditis elegans* - reversion – fitness - amphids