



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/  
Eprints ID : 18020](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 18020)

**To cite this version :**

Eichstadt, Maxime. *Évaluation de la résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques dans quatre élevages ovins allaitants de Corrèze*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 157 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# EVALUATION DE LA RESISTANCE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX AUX ANTHELMINTHIQUES DANS QUATRE ELEVAGES OVINS ALLAITANTS DE CORREZE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**EICHSTADT, Maxime**  
Né, le 01 janvier 1991 MELUN (77)

---

**Directeur de thèse : M. Philippe JACQUIET**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Alexis VALENTIN**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**M. Philippe JACQUIET**  
**M. Emmanuel LIENARD**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :  
**Mme Christelle ROY**

Directrice du Groupement de Défense Sanitaire de Corrèze (GDS19)



**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt**  
**ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

**Directrice** : **Madame Isabelle CHMITELIN**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*  
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

## **REMERCIEMENTS**

### **A Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN**

Professeur des Universités  
Praticien Hospitalier  
*Parasitologie – Zoologie*

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.  
Nos sincères remerciements et nos hommages respectueux.*

### **A Monsieur le Professeur Philippe JACQUIET**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.  
*Parasitologie et Maladies parasitaires – Zoologie*

*Qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse et pour nous avoir proposé ce sujet.  
Qu'il trouve ici nos sincères remerciements pour sa disponibilité, son aide précieuse et sa pédagogie  
lors de ce travail comme durant les cinq années de formation au métier de vétérinaire.  
Profonde gratitude.*

### **A Monsieur le Docteur Emmanuel LIENARD**

Enseignant-chercheur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
*Parasitologie et Maladie parasitaires – Zoologie*

*Qui nous a fait l'honneur de prendre part à notre jury de thèse.  
Sincères remerciements.*

### **A Madame le Docteur Christelle ROY**

Directrice du Groupement de Défense Sanitaire de Corrèze (GDS19)

*Qui est à l'initiative de ce projet, et sans qui cette thèse n'aurait pas été réalisable.  
Pour son accueil, sa disponibilité et son implication dans ce travail.  
Merci d'avoir pris part à ce jury de thèse. Profonde gratitude.*



**A l'ensemble des personnes ayant contribué à ce travail,**

**A Madame Manon GUILLERM**

Etudiante en DUT Génie Biologique à Brest

*Pour avoir réalisé les manipulations PCR et l'identification morphologique des larves.*

*Merci pour ton aide précieuse, je te souhaite le meilleur dans ton parcours professionnel.*

**A Madame Christelle GRISEZ et Madame Françoise PREVOT**

Ingénieures de recherche

Laboratoire de parasitologie – Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pour votre précieuse contribution à la réalisation des manipulations PCR et pour votre regard bienveillant lors de la réalisation des coproscopies et coprocultures.*

*Sincères remerciements.*

**A Mesdames et Messieurs les éleveurs ayant pris part à l'étude**

*Merci pour votre contribution à ce travail, votre gentillesse et votre accueil toujours chaleureux.*

*Profonde gratitude.*





## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	9
TABLE DES TABLEAUX.....	17
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	19
TABLE DES ANNEXES .....	20
LISTE DES ABREVIATIONS .....	21
INTRODUCTION .....	23
PARTIE 1 : BIOLOGIE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX ET MAITRISE DES STRONGYLOSES GASTRO-INTESTINALES DES OVINS.....	25
1. Généralités sur les strongles gastro-intestinaux des ovins .....	27
1.1. Classification .....	27
1.2. Espèces majeures et distribution géographique des strongles gastro-intestinaux..	29
1.3. Cycle de développement des strongles gastro-intestinaux.....	30
1.3.1. Le stade libre .....	31
1.3.2. Le stade parasitaire .....	33
2. Les strongyloses gastro-intestinales ovines .....	33
2.1. Modalités de l'infestation .....	33
2.1.1. Facteurs de variation de l'infestation .....	33
2.1.2. Chronologie de l'infestation .....	35
2.2. Expression clinique des strongyloses.....	36
2.3. Physiopathogénie.....	37
2.3.1. Mécanismes physiopathologiques à l'échelle tissulaire .....	37

• Action traumatique .....	37
• Action chimique .....	37
• Action spoliatrice.....	38
• Action antigénique .....	38
2.3.2. Mécanismes physiopathologiques à l'échelle de l'organisme .....	39
• Diminution de l'appétit .....	39
• Malabsorption .....	39
• Modification du métabolisme .....	40
2.4. Conséquences économiques des strongyloses.....	40
3. Le diagnostic des strongyloses .....	41
3.1. Indicateurs cliniques .....	41
3.1.1. NEC et variation du GMQ.....	41
3.1.2. Index de souillure de l'arrière train ( <i>Dag-Score</i> ) et consistance des fécès (index DISCO).....	41
3.1.3. Méthode FAMACHA® .....	43
3.2. Diagnostic de laboratoire.....	44
3.2.1. Coproscopies quantitatives .....	44
• Réalisation et conservation des prélèvements .....	45
• Examen microscopique des prélèvements .....	45
• Interprétation des coproscopies .....	48
3.2.2. Coprocultures de mélange .....	51
• Extraction des larves L3.....	51
• Identification morphologique des L3 .....	52
• Interprétation des coprocultures .....	55
3.2.3. Identification moléculaire par <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (qPCR).....	55

• Principe de l'amplification par PCR .....	56
• Application en parasitologie .....	57
3.2.4. Dosage du pepsinogène plasmatique .....	58
3.2.5. Diagnostic post-mortem des strongyloses.....	59
4. Les traitements pharmacologiques : utilisation des anthelminthiques de synthèse.....	61
4.1. Les familles d'anthelminthiques disponibles.....	62
4.1.1. Benzimidazoles et pro-benzimidazoles .....	62
4.1.2. Imidazothiazoles et Tétrahydropyrimidines .....	64
4.1.3. Salicylanilides.....	65
4.1.4. Lactones macrocycliques.....	66
4.1.5. Dérivés d'aminocétonitrile (AADs).....	69
4.1.6. Spiroindoles.....	70
4.2. La gestion traditionnelle du parasitisme en élevage .....	71
5. Les méthodes alternatives aux traitements de synthèse.....	71
5.1. La gestion des pâtures .....	71
5.1.1. Dilution du risque parasitaire par réduction de la densité larvaire .....	72
• Gestion de la densité de population .....	72
• Pâturages mixtes .....	72
• Mélange d'animaux sensibles et résistants .....	73
5.1.2. Utilisation de la mortalité naturelle des larves : la rotation des pâtures .....	74
5.1.3. Destruction des stades libres de strongles gastro-intestinaux .....	75
• Les champignons nématophages .....	75
• Les spores de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	76
• Les particules de cuivre .....	76
5.2. Les méthodes basées sur l'amélioration de la résistance de l'hôte .....	77
5.2.1. Importance de l'alimentation dans le contexte parasitaire.....	77

5.2.2. Amélioration de l'immunité grâce à la vaccination .....	78
5.2.3. Sélection génétique d'ovins naturellement résistants .....	78
5.2.4. Utilisation d'anthelminthiques naturels : les tannins .....	79
PARTIE 2 : LA RESISTANCE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX AUX ANTHELMINTHIQUES DE SYNTHESE .....	81
1. Principes de la résistance aux anthelminthiques .....	83
1.1. Introduction et définition de la résistance aux anthelminthiques .....	83
1.2. Mécanismes d'apparition et de transmission de résistance .....	84
1.2.1. Rappel des bases génétiques utilisées en parasitologie .....	84
1.2.2. Acquisition de résistance par un ou plusieurs individus .....	84
1.2.3. Transmission de la résistance au sein d'une population .....	85
1.3. Mécanismes de résistance aux anthelminthiques de synthèse .....	86
1.3.1. Mécanismes non-spécifiques .....	86
1.3.2. Mécanismes spécifiques .....	86
• Mécanismes de résistance aux benzimidazoles et aux pro-benzimidazoles .....	87
• Mécanismes de résistance au lévamisole .....	87
• Mécanismes de résistance aux lactones macrocycliques .....	87
• Mécanismes de résistance aux dérivés d'amino-acétonitrile .....	88
2. La résistance aux anthelminthiques dans les cheptels ovins .....	89
2.1. Conséquences de l'utilisation non-maitrisée des anthelminthiques .....	89
2.2. Les facteurs favorisant la transmission de la résistance .....	89
2.2.1. Facteurs liés à la génétique et à la biologie des strongles gastro- intestinaux .....	90
• Facteurs génétiques .....	90
• Facteurs biologiques .....	91

2.2.2. Facteurs liés à la conduite d'élevage.....	91
• Fréquence d'utilisation d'un anthelminthique .....	91
• Sous-dosage .....	92
• Rémanence des molécules.....	92
• Introduction d'individus résistants dans l'élevage.....	93
• Traitements systématiques et non-sélectifs .....	93
• Traitements par inadvertance.....	93
2.3. Etat des lieux des résistances à l'heure actuelle.....	93
2.3.1. Dans le monde.....	93
• Hémisphère sud .....	94
• Europe .....	95
2.3.2. En France .....	95
3. Prévention de l'apparition des résistances : l'utilisation raisonnée des anthelminthiques .....	97
3.1. La gestion de la charge parasitaire .....	97
3.1.1. La notion de « refuge » .....	97
3.1.2. Application de traitements ciblés et sélectifs .....	98
3.2. Applications des bonnes pratiques d'utilisation des anthelminthiques.....	99
3.2.1. Administration de doses adaptées.....	99
3.2.2. Alternance et combinaison de familles d'anthelminthiques .....	99
• Alternance de famille d'anthelminthiques .....	99
• Combinaison de traitements anthelminthiques .....	100
3.2.3. Association des anthelminthiques et de la gestion des pâtures.....	100
3.2.4. Mesures de quarantaine suite à l'introduction d'animaux.....	101
4. Identification des résistances en élevage ovin .....	102
4.1. Mise en évidence de la résistance <i>in-vivo</i> .....	102

4.1.1. Le FECRT ( <i>Fecal Egg Count Reduction Test</i> ) .....	102
• Réalisation .....	102
• Calcul du FECR .....	103
• Interprétation et limites du FECRT .....	104
4.1.2. Infestations expérimentales ( <i>Controlled Anthelmintic Efficacy Test</i> ) .....	105
4.2. Mise en évidence de résistance <i>in-vitro</i> .....	105
4.2.1. Le <i>Egg Hatch Test (EHT)</i> et le <i>Test de Développement larvaire (LDT)</i> .....	105
4.2.2. Méthodes moléculaires de détection d'allèles de résistance.....	106
PARTIE 3 : EVALUATION DE LA RESISTANCE AUX ANTHELMINTHIQUES DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX DANS QUATRE ELEVAGES DE CORREZE .....	109
1. Introduction .....	111
2. Matériel et méthode .....	112
2.1. Sélection des élevages participant à l'étude.....	112
2.2. Protocole expérimental en élevage .....	113
2.2.1. Constitution des lots .....	113
2.2.2. Administration des traitements .....	114
2.2.3. Prélèvement des brebis.....	114
2.3. Exploitation des prélèvements au laboratoire .....	115
2.3.1. Coproscopies et calcul du FECR.....	115
2.3.2. Réalisation des cultures larvaires.....	115
2.3.3. Manipulations préalables à l'identification moléculaire des L3 par qPCR.....	116
• Contrôles positifs utilisés pour évaluer la spécificité des réactions PCR.....	116
• Extraction de l'ADN des L3 et adultes .....	116
• Caractérisation de la réaction PCR.....	116
• Vérification de la spécificité des amorces et sondes PCR .....	117

•	Sensibilité de détection et répétabilité des manipulations .....	118
•	Détermination des courbes standards de chaque espèce .....	119
2.3.4.	Dénombrement et identification morphologique des larves L3.....	119
2.3.5.	Dénombrement et identification moléculaire par qPCR des larves L3 .....	120
3.	Résultats .....	121
3.1.	Coprosopies.....	121
3.1.1.	Résultats du FECRT .....	121
3.1.2.	Interprétation des FECRT .....	122
3.2.	Cultures larvaires .....	122
3.2.1.	Nombre de larves et proportions relatives des espèces de strongles par identification morphologique.....	122
3.2.2.	Nombre de larves et proportions relatives des espèces de strongles identifiées par qPCR .....	124
3.3.	Comparaison des deux méthodes d'identification larvaire.....	125
3.3.1.	Corrélation du comptage total des L3 entre les deux méthodes .....	125
3.3.2.	Corrélation des proportions relatives des espèces.....	125
4.	Discussion .....	126
4.1.	Efficacité des anthelminthiques dans les quatre élevages étudiés .....	126
4.1.1.	Mise en évidence de résistances aux benzimidazoles .....	126
4.1.2.	Suspicion de résistances aux lactones macrocycliques.....	127
4.2.	Intérêts et limites des méthodes d'identification morphologique et moléculaire des larves infestantes obtenues par coproculture.....	129
CONCLUSION .....		133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....		134
ANNEXES.....		143





## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification et localisation des principales espèces de SGI (d'après Lefèvre, Blancou, Chermette 2003) .....	28
Tableau 2 : Corrélation entre la note FAMACHA et l'hématocrite (d'après Fondraz 2012) ....	43
Tableau 3 : Charges parasitaires entraînant des conséquences cliniques sévères chez les ovins (d'après Brard, Chartier 1997) .....	49
Tableau 4 : Spectres d'action, posologies et restrictions d'usage des benzimidazoles utilisés (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014).....	63
Tableau 5 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage du lévamisole en élevage ovin (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014).....	64
Tableau 6 : Spectres d'action, posologies et restrictions d'usage des salicylanilides utilisés en élevage ovin (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014). .....	66
Tableau 7 : Spectres d'action, posologies et restrictions d'usage des lactones macrocycliques utilisées en élevage ovin (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014 et modifié selon l'évolution de la réglementation).....	68
Tableau 8 : Spectre d'action, posologie et restrictions d'usage du monépantel en élevage ovin (d'après Hafsi, China, Ghalmi 2012). .....	69
Tableau 9 : Spectre d'action, posologie et restrictions d'usage du derquantel (+ abamectine) en élevage ovin (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014; Epe, Kaminsky 2013) .....	70
Tableau 10 : Historique de l'apparition de résistance en élevage ovin dans le monde (d'après Kotze, Prichard 2016) .....	94
Tableau 11 : Enquêtes sur la prévalence de la résistance aux anthelminthiques en France. .	96
Tableau 12 : Description des élevages sélectionnés .....	113
Tableau 13 : Cq de chaque espèce lorsque l'ADN de celle-ci est minoritaire dans un mélange .....	118
Tableau 14 : FECR et intervalles de confiance à 95% des lots étudiés .....	121

Tableau 15 : Dénombrement des larves et proportions relatives des différentes espèces obtenues par identification morphologique après coproculture pour chaque lot. ....	123
Tableau 16 : Dénombrement des larves et proportions relatives des différentes espèces obtenues par identification moléculaire après coproculture pour chaque lot. ....	124
Tableau 17 : Corrélation entre les deux méthodes de comptage des L3 .....	125

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Cycle de développement des strongles abomasaux (d'après VetAgro Sup) .....	31
Figure 2 : Effet de la température sur le développement des œufs en larve L3 des principales espèces de SGI (d'après O'Connor, Walkden-Brown, Kahn 2006).....	32
Figure 3 : Contamination des prairies par les œufs et L3 de SGI selon la période de l'année (d'après Abbott, Taylor, Stubbings 2012) .....	35
Figure 4 : Echelle de notation du Dag-Score (d'après Bonnefont, Canellas 2014) .....	41
Figure 5 : Morphologie des principaux œufs de strongles gastro-intestinaux au microscope optique x400 (crédit photo : Service de Parasitologie ENVA).....	45
Figure 6 : Schéma d'une lame de Mac Master .....	46
Figure 7 : Principe de la coproscopie de mélange (d'après Bonnefont et Canellas, 2014) .....	48
Figure 8 : Relation entre l'excrétion fécale et la charge parasitaire chez les ovins (d'après McKenna 1985). .....	50
Figure 9 : Morphologie générale d'une larve L3 de nématode (d'après Van Wyk, Mayhew 2013).....	53
Figure 10 : Clé de détermination des principales espèces de strongles gastro-intestinaux des ovins, sur la base de critères morphologiques (d'après Van Wyk, Mayhew 2013).....	54
Figure 11 : Adultes <i>H. contortus</i> à la surface de la muqueuse abomasale (crédit RM. KAPLAN). .....	60
Figure 12 : Lésions macroscopiques abomasales dues à une infestation par <i>T.circumcincta</i> (Crédit RM. KAPLAN) .....	60
Figure 13 : Fréquence des allèles de résistance et apparition de résistances dans un cheptel (d'après Taylor, 2013). .....	85
Figure 14 : Diversité des mécanismes de résistance aux anthelminthiques (d'après Kotze, Prichard 2016). .....	88
Figure 15 : Génotypes selon la fréquence des allèles de résistance dans la population (d'après Abbott, Taylor, Stubbings 2012) .....	90

## TABLE DES ANNEXES

Annexe 1: Evaluation de la NEC des ovins : grille de notation (d'après Adjou 2013)).....	143
Annexe 2 : Nuancier utilisé et instructions dans le cadre de la méthode FAMACHA (d'après Fondraz 2012) .....	144
Annexe 3 : Morphologie et taille des larves L3 des principales espèces de nématodes des ovins (d'après Van Wyk, Mayhew 2013).....	145
Annexe 4 : Extrémités craniales et caudales des larves L3 des principales espèces de nématodes des ovins (d'après Van Wyk, Mayhew 2013) .....	146
Annexe 5 : Calcul de l'intervalle de confiance à 95%.....	147
Annexe 6 : Situations géographiques en Corrèze des élevages participants à l'étude .....	148
Annexe 7 : Comparaison de la spécificité des amorces <i>Forward</i> LNA et de McNally sur des souches européennes de <i>H. contortus</i> , <i>T. circumcincta</i> et <i>T. colubriformis</i> .....	149
Annexe 8 : Amorces et sondes PCR utilisées.....	150
Annexe 9 : Vérification de la spécificité des réactions PCR sur des vers adultes provenant du tube digestif d'agnelles à l'abattoir.....	150
Annexe 10 : Test de répétabilité des manipulations PCR .....	151
Annexe 11 : Courbes standards PCR des 3 espèces étudiées .....	152
Annexe 12 : Détail des coproscopies individuelles et du calcul des intervalles de confiance de l'élevage A. ....	154
Annexe 13 : Détail des coproscopies individuelles et du calcul des intervalles de confiance de l'élevage B. ....	155
Annexe 14 : Détail des coproscopies individuelles et du calcul des intervalles de confiance de l'élevage C. ....	156
Annexe 15 : Détail des coproscopies individuelles et du calcul des intervalles de confiance de l'élevage D. ....	157

## LISTE DES ABREVIATIONS

BZ : Benzimidazoles

FEC : Fecal Egg Count (intensité de l'excrétion fécale en œufs par gramme (opg))

FECR : Fecal Egg Count Reduction (reduction de l'excrétion fécale en %)

FECRT : Fecal Egg Count Reduction Test (test de réduction de l'excrétion fécale)

g : Gramme

GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GEP : Gastro-entérite parasitaire

GMQ : Gain moyen quotidien (relatif au poids)

IVM : Ivermectine

LM : Lactones macrocycliques

LV : Lévamisole

mL : Millilitre

MOX : Moxidectine

MS : Matière sèche

OPG : Œufs par gramme de matière fécale

SGL : Strongles gastro-intestinaux

STE : Sheath Tail Extension

TWC : Total Worm Count



## INTRODUCTION

Les Nématodes sont des parasites d'importance économique majeure chez les animaux de rente dans le monde. Le parasitisme des ovins par les strongles gastro-intestinaux est responsable, à l'échelle individuelle, de symptômes cliniques pouvant conduire dans les cas les plus graves à la mort, mais surtout d'une baisse de production non-négligeable à l'échelle du troupeau.

Pour pallier à cela, plusieurs molécules anthelminthiques de synthèse ont été développées à partir des années 1950. Celles-ci ont permis de contrôler la charge parasitaire dans les élevages et ainsi limiter les carences, maladies et baisses de production.

Le succès de ces nouveaux traitements fut immédiat et leur usage s'est largement répandu dans les élevages bovins et ovins d'Australie, de Nouvelle-Zélande, d'Amérique et d'Europe. Progressivement, il a été constaté une perte d'efficacité de ces anthelminthiques, et les premiers cas de résistance à ces molécules ont été rapportés quelques années après leur mise sur le marché. Ainsi, l'utilisation intensive et systématique de ces traitements a sélectionné des vers ayant acquis les capacités d'échapper à leur action, et qui, en se reproduisant, ont généré des populations insensibles aux anthelminthiques.

Aujourd'hui, les éleveurs font face à ce problème et à la pression de l'opinion publique, qui réclame des conditions d'élevage plus respectueuses de l'environnement et du bien-être animal et la diminution de l'utilisation de traitements de synthèse. Il est donc désormais nécessaire de limiter à un usage raisonné l'utilisation des anthelminthiques encore efficaces, et de développer des méthodes alternatives de lutte contre les strongles gastro-intestinaux.

Après la présentation de la biologie des strongles gastro-intestinaux des ovins et des moyens actuels pour limiter le parasitisme, sera abordé le phénomène de résistance aux anthelminthiques, ses modalités et les méthodes pour la détecter en élevage. Enfin, la troisième partie de cette thèse consistera en une enquête sur la résistance aux anthelminthiques dans quatre élevages ovins allaitants de Corrèze.





**PARTIE 1 : BIOLOGIE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX ET  
MAITRISE DES STRONGYLOSES GASTRO-INTESTINALES DES OVINS**



## 1. Généralités sur les strongles gastro-intestinaux des ovins

### 1.1. Classification

Les nématodes parasites du tractus digestif des petits ruminants d'importance vétérinaire sont communément nommés strongles gastro-intestinaux (SGI). Leur cycle biologique comporte une phase larvaire libre dans l'environnement et une phase parasitaire dans la caillette, l'intestin grêle ou le colon de l'hôte, de manière spécifique selon l'espèce.

Les strongles gastro-intestinaux provoquent de graves conséquences médicales et économiques dans les élevages. Les strongyloses sont fréquentes au pâturage et sont donc des pathologies majeures en élevage de petits ruminants.

Les SGI appartiennent à l'ordre des Strongylida. Parmi les Strongylida, on trouve deux super-familles d'intérêt (Jacquet 1997) :

- Les Trichostrongylidae : les strongles appartenant à cette super-famille sont les plus pathogènes. Ils présentent une capsule buccale absente ou rudimentaire. Il en existe de nombreux genres : *Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus* etc.
- Les Strongylidae : leurs capsules buccales sont bien développées. Les genres *Chabertia* et *Oesophagostomum* appartiennent à cette super-famille dont la pathogénicité est le plus souvent faible chez les petits ruminants.

On observe chez la plupart des ovins au pâturage un poly-parasitisme : plusieurs espèces de strongles colonisent différentes portions du tube digestif des ruminants au même moment chez un même individu, constituant une communauté d'helminthes. Certaines espèces de SGI ont une action pathogène majeure (*Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia circumcincta*) tandis que d'autres (*Cooperia curticei*, *Nematodirus filicollis*, *Oesophagostomum venulosum*, *Chabertia ovis*) sont rarement pathogènes seuls, mais contribuent aux gastro-entérites parasitaires (GEP) en cas de poly-parasitisme (Zajac 2006).

Tableau 1 : Classification et localisation des principales espèces de SGI (d'après Lefèvre, Blancou, Chermette 2003)

Super-famille	Famille	Sous-famille	Genre	Espèce	Hôtes	Localisation adultes	Répartition géographique
Trichostrongyloidea	Trichostrongylidés	Haemonchinés	<i>Haemonchus</i>	<i>contortus</i>	Ovins, Caprins	Abomasum	Cosmopolite, zones tropicales humides ++
				<i>placei</i>	Bovins		
				<i>bispinosus</i>	Ovins, Caprins		
				<i>longistipes</i>	Camélins, Ovins, Caprins		
		Trichostrongylinés	<i>Trichostrongylus</i>	<i>axei</i>	Bovins, Ovins, Caprins, Equidés, Porcin	Abomasum	Cosmopolite
				<i>colubriformis</i>	Ovins, Caprins (Bovins)		
				<i>vitrinus</i>	Ovins, Caprins	Intestin grêle	
				<i>capricola</i>	Ovins, Caprins		
				<i>probolurus</i>	Camélins (Ovins, Caprins, Bovins)		
				<i>ostertagi</i>	Bovins (Ovins)		
		<i>leptaspicularis</i>	Cervidés (Ovins)				
		Ostertagiinés	<i>Ostertagia</i>	<i>circumcincta</i>	Ovins, Caprins	Abomasum	Cosmopolite
			<i>Teladorsagia</i>	<i>Cooperia</i>	<i>curticei</i>	Ovins, Caprins	Intestin grêle
		Cooperiinés	<i>oncophora</i>		Bovins		
	<i>punctata</i>		Bovins				
	<i>pectinata</i>		Bovins				
	Molinéidés	Nematodirinés	<i>Nematodirus</i>	<i>filicollis</i>	Ovins, Caprins (Bovins)	Intestin grêle	Cosmopolite
<i>spathiger</i>				Ovins, Caprins (Bovins)			
<i>battus</i>				Ovins (Bovins)	Nord Europe		
Strongyloidea	Strongylidés	Chabertiinés	<i>Chabertia</i>	<i>ovina</i>	Ovins, Caprins (Bovins)	Colon	Cosmopolite
	Trichonématidés	Oesophagostomatiinés	<i>Oesophagostomum</i>	<i>colombianum</i>	Ovins, Caprins (Camélins)	Colon	Cosmopolite
				<i>venulosum</i>	Ovins, Caprins		
				<i>radiatum</i>	Bovins, Buffle		

## 1.2. Espèces majeures et distribution géographique des strongles gastro-intestinaux

Parmi les espèces de SGI citées précédemment, *H. contortus*, *T. colubriformis* et *T. circumcincta* engendrent le plus de conséquences néfastes chez les petits ruminants et font l'objet d'un intérêt particulier en parasitologie.

### ○ *Haemonchus contortus*

Cette espèce est celle qui pose généralement le plus de problème en élevage ovin dans le monde. Les femelles matures mesurent environ 3 cm de long, ce qui les rend parfaitement visibles à la surface de la muqueuse de la caillette lors d'autopsies. *H. contortus* est la plus grande espèce de SGI en terme de dimension, mais également l'une des plus prolifiques avec plusieurs milliers d'œufs produits par jour et par femelle, ce qui compense la courte durée de vie des adultes chez l'hôte, qui est de quelques mois au plus (Coyne, Smith, Johnstone 1991). Les larves L4 et les adultes sont hématophages et sont fréquemment responsables d'anémie chronique (Van Wyk, Bath 2002).

Le développement optimal des larves d'*H. contortus* s'effectue à climat chaud et humide, mais celles-ci ne tolèrent que peu les basses températures et la sécheresse. En régions tropicales (Asie du Sud-est, sud de l'Inde, Afrique et Amérique centrale), les larves peuvent atteindre le stade infestant L3 en seulement 4 à 10 jours après éclosion (cf 1.3.) (O'Connor, Walkden-Brown, Kahn 2006, Zajac 2006). Bien que ne pouvant se développer à des températures inférieures à 10°C, *H. contortus* est également présent en milieu tempéré grâce au phénomène d'hypobiose (cf 1.3.2.)

### ○ *Teladorsagia circumcincta*

*T. circumcincta* est également un parasite de la caillette des petits ruminants, plus petit (environ 1 cm de long) et moins prolifique que *H. contortus*, avec environ 200 œufs produits par jour et par femelle. Les adultes sont hématophages mais, contrairement à *H. contortus*, les larves L4 sont histophages et se développent dans les glandes de la muqueuses abomasale. Bien que doté d'une pathogénicité inférieure à celle de *H. contortus*, *T. circumcincta* entraîne fréquemment une malabsorption et une diarrhée profuse, responsables de retard de croissance ou d'amaigrissement marqué.

*T. circumcincta* se développe préférentiellement dans les régions à climat tempéré et est absente des régions tropicales et subtropicales. Sa résistance à la dessiccation, supérieure à celle de *H. contortus*, lui permet de survivre aux étés chauds et secs, fréquents en région méditerranéenne (O'Connor, Walkden-Brown, Kahn 2006).

- *Trichostrongylus colubriformis*

*T. colubriformis* est un parasite de l'intestin grêle des petits ruminants qui mesure 5 à 6 mm de long. Il est très souvent retrouvé en présence de *T. circumcincta* et participe ainsi aux GEP. Les femelles sont peu prolifiques (200 œufs par jour) mais, contrairement aux deux espèces citées précédemment, les adultes ont la capacité de survivre à l'hiver dans le tube digestif de l'hôte (Zajac 2006).

*T. colubriformis* est chymivore, son infestation chez l'hôte entraîne une atrophie des villosités intestinales et des lésions d'entérite congestive catarrhale ou exsudative (Lefèvre, Blancou, Chermette 2003). Ainsi, au même titre que *T. circumcincta*, il est responsable, dans la forme aiguë, de diarrhées profuses, de déshydratation et de mortalité chez l'agneau et, dans la forme chronique, de diarrhées intermittentes et d'une baisse de production chez l'adulte.

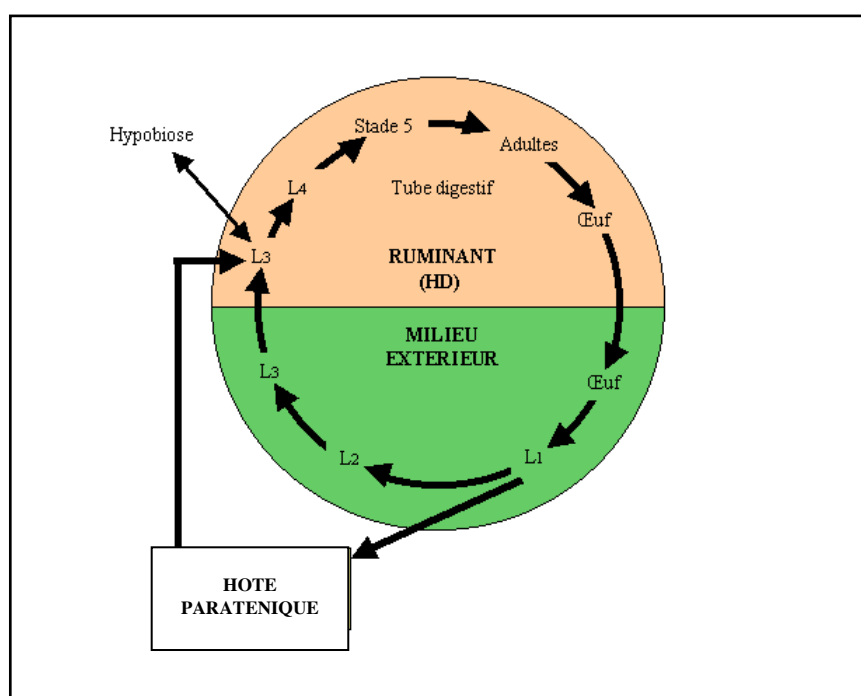
*T. colubriformis* est une espèce cosmopolite. Elle se développe dans les régions à climat tempéré, subtropical et tropical mais est légèrement plus sensible aux basses températures (voir 1.3.1.)

### 1.3. Cycle de développement des strongles gastro-intestinaux

Le cycle de développement des SGI est un cycle évolutif monoxène, c'est-à-dire qu'un seul hôte, l'hôte définitif, est nécessaire à l'accomplissement du cycle.

Chez les trois espèces présentées précédemment, le cycle est identique. Il est constitué d'une phase exogène où les stades larvaires sont libres dans le milieu extérieur, et d'une phase endogène où interviennent les stades parasites dans le tube digestif des petits ruminants.

Figure 1 : Cycle de développement des strongles abomasaux (d'après VetAgro Sup)



### 1.3.1. Le stade libre

Les œufs non-embryonnés produits par les femelles adultes sont évacués dans l'environnement au sein des matières fécales. Ces œufs, si les conditions d'humidité et de température sont favorables, vont éclore pour former une larve L1. Celle-ci se nourrit de microparticules et de microorganismes contenus dans les fèces puis mue en larve L2 qui, de manière similaire, forme une larve L3 infestante. La larve L3 est protégée par l'exuvie de L2 et ne se nourrit pas. Ses réserves glycogéniques et lipidiques lui permettent de s'extraire et s'écarter de la matière fécale. Elle va, par la suite, migrer verticalement sur les brins d'herbe à une dizaine de centimètres au-dessus du sol pour optimiser ses chances d'être ingérée par un ruminant.

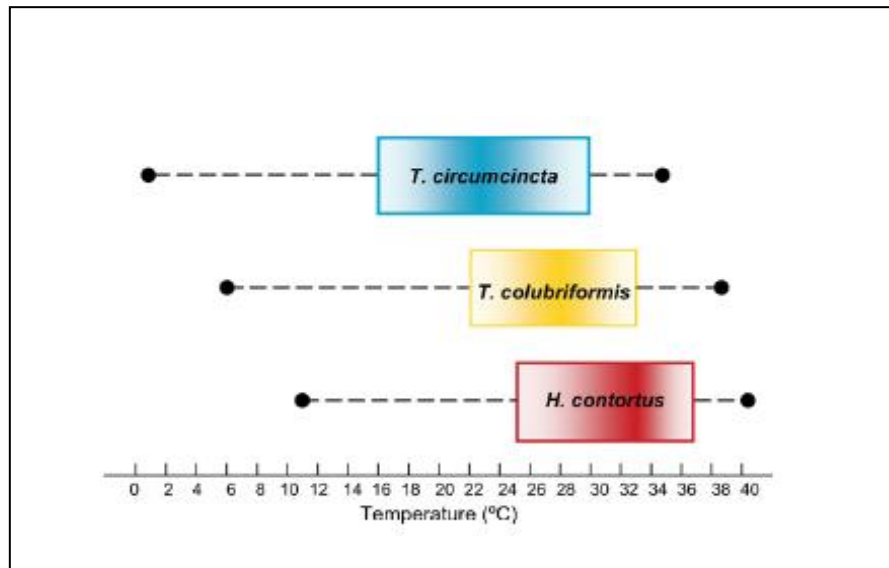
Les conditions climatiques, en particulier la température et l'humidité, influent grandement sur la capacité des œufs à atteindre le stade L3. Les matières fécales offrent un environnement propice au développement : les œufs et les stades L1 et L2 évoluent dans un milieu saturé en humidité mais exposé aux changements de températures. O'Connor et *al.* ont précisé en 2006 les températures idéales et limites au développement des stades



larvaires des trois espèces majeures (figure 2). Ainsi, une température comprise entre 18°C et 30° est en général favorable au développement des stades libres des SGI. Lorsque les températures sont inférieures, le développement n'est pas possible pour certaines espèces. Ainsi, *H. contortus* ne se développe pas en dessous de 10°C. Pour une température de 5°C, plus de 20% des œufs de *T. circumcincta* atteindront le stade L3, contre seulement 5% des œufs de *T. colubriformis* (O'Connor, Walkden-Brown, Kahn 2006).

En région tempérée, lorsque les températures sont faibles en début de printemps, les larves peuvent mettre quelques semaines à plusieurs mois pour se développer, contre seulement une à deux semaines en été. Ces deux cinétiques de développement entraînent généralement un pic larvaire d'été, car les larves issues de la mise à l'herbe en début de printemps et celles plus tardives atteignent le stade infestant simultanément (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

**Figure 2** : Effet de la température sur le développement des œufs en larve L3 des principales espèces de SGI (d'après O'Connor, Walkden-Brown, Kahn 2006).



Les boîtes représentent les températures idéales au développement des L3, avec un optimum de température indiqué par la coloration intense. En dehors des températures représentées par les lignes en pointillés, le développement est impossible.

### 1.3.2. Le stade parasitaire

Une fois ingérée, la larve L3 se libère de son exuvie sous l'effet des conditions physico-chimiques du tube digestif. Elle pénètre par la suite dans la muqueuse de l'organe cible puis mue rapidement en L4, qui retourne dans la lumière du tube digestif pour évoluer en L5 ou stade juvénile. Les L5 sont par la suite considérées comme adultes une fois la maturité sexuelle acquise.

Le temps nécessaire à l'acquisition de la maturité sexuelle depuis l'ingestion d'une L3 définit la période prépatente de l'espèce : celle-ci varie de 2 à 3 semaines chez les SGI, lorsque les conditions extérieures sont favorables. En effet, le développement des L4 en L5 peut être inhibé lorsque le climat n'est pas propice à la survie des larves dans le milieu extérieur : c'est le phénomène d'hypobiose, bien décrit chez *H. contortus*. Ainsi, lors d'hivers secs et froids, une partie des larves arrête momentanément son développement au stade L4, au sein de la muqueuse des organes du tube digestif. Elles échappent aux réactions immunitaires de l'hôte et réactivent leur développement 3 à 4 mois plus tard, au début du printemps (levée d'hypobiose), les températures et l'hygrométrie étant alors favorables au développement des L3. Ce phénomène d'hypobiose est actuellement un problème en élevage, car les L4 enkystées sont moins sensibles aux anthelminthiques, et leur réactivation simultanée constitue un pic larvaire de printemps (Zajac 2006)

## **2. Les strongyloses gastro-intestinales ovines**

### 2.1. Modalités de l'infestation

#### 2.1.1. Facteurs de variation de l'infestation

Les sources principales de parasitisme au pâturage sont les animaux de même espèce, en raison d'une spécificité d'hôte étroite des SGI. Si les ovins et les caprins partagent plusieurs espèces de SGI, les bovins et ovins sont parasités par des SGI de même genre (*Haemonchus*, *Trichostrongylus*) mais d'espèces différentes (voir tableau 1). Il existe tout de même des exceptions :

- *T. axei* peut infester de nombreuses espèces d'herbivores (bovins, ovins, caprins, équidés).

- Il a déjà été observé des contaminations de jeunes bovins par *H. contortus* et d'ovins par *H. placei* : on parle alors de contamination croisée (Zajac 2006).

Le rôle de la faune sauvage dans le parasitisme des petits ruminants semble négligeable.

Outre l'espèce hôte, il existe d'autres facteurs de variation de l'infestation :

- **La race** : certaines races d'origine tropicale (Barbados Blackbelly, Santa Ines, Ste Croix) résistent naturellement aux infestations par *H. contortus* (Cardia et al. 2011, Aumont, Gruner, Hostache 2003).

- **L'âge** : les jeunes ont un système immunitaire naïf lors de la première saison de pâturage. Ils sont plus sensibles aux infestations et vont manifester plus de signes cliniques que les adultes.

- **Le statut physiologique** : la gestation et la lactation, en raison d'une nette baisse de l'immunité de l'hôte pendant environ huit semaines (centrée sur l'agnelage), sont des statuts physiologiques à risque et sont responsables d'une contamination rapide des prairies au début du printemps. Trois mécanismes sont à l'origine de l'augmentation peripartum de l'excrétion fécale d'œufs de SGI chez les femelles (ou « *Periparturient Rise* »), concomitante à l'immunosuppression (Abbott, Taylor, Stubbings 2012) :

- L'infestation de l'hôte par des larves présentes au pâturage est facilitée.
- Les adultes présents dans le tube digestif des brebis au moment du peripartum deviennent plus prolifiques pendant cette période.
- Les L4 en hypobiose achèvent leur développement en vers adultes qui vont excréter à leur tour. Il est à noter que d'autres stimuli, encore méconnus, participent à la levée d'hypobiose.

- **La résistance génétique individuelle** de l'hôte (Stear, Wakelin 1998).

Ces facteurs sont responsables d'une distribution hétérogène ou agrégée des SGI chez leurs hôtes : seulement 20% des individus d'un cheptel hébergent 80% des strongles de l'élevage (Shaw, Dobson 1995).

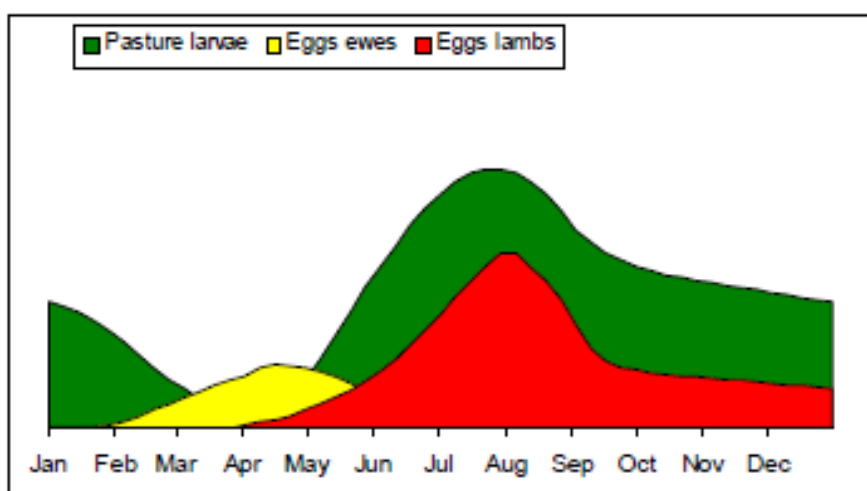
### 2.1.2. Chronologie de l'infestation

Les principales sources de contamination des prairies à la sortie de l'hiver sont les quelques larves L3 qui ont survécu aux basses températures et à la dessiccation. Cette période correspond, dans de nombreux élevages, à la saison d'agnelage. Ainsi, le phénomène de *Periparturient Rise* permet une augmentation rapide du nombre d'œufs excrétés avant l'arrivée des nouveau-nés naïfs sur les pâtures.

Par la suite, les nouveau-nés commencent à être exposés aux larves L3 infestantes, tandis que l'excrétion chez les mères diminue. En raison de la lenteur de l'évolution des œufs en L3 au début du printemps, les premiers signes cliniques chez les agneaux apparaissent deux à trois mois après, au début de l'été. Les jeunes jouant le rôle de multiplicateurs au sein du troupeau, l'excrétion et la sévérité des signes cliniques sont maximales en août (voir figure 3). On assiste lors de cette période à un pic larvaire d'été (voir 1.3.1.), puis l'excrétion et le nombre de larves infestantes décroît progressivement.

Il est à noter que ce schéma classique peut être modifié selon la conduite d'élevage, et notamment la saison d'agnelage.

Figure 3 : Contamination des prairies par les œufs et L3 de SGI selon la période de l'année (Abbott, Taylor, Stubbings 2012)



## 2.2. Expression clinique des strongyloses

Les symptômes observés lors de strongyloses peuvent être de types aigus ou chroniques suivant l'âge de l'animal, la sévérité de l'infestation et l'espèce parasitaire impliquée.

- Les manifestations aiguës des infestations par *T. circumcincta* et *T. colubriformis* concernent généralement les jeunes animaux naïfs dans leur première année de pâturage, pour lesquels l'infestation est massive. Les signes cliniques surviennent au début de l'été, et il est fréquemment retrouvé un abattement, une diarrhée intermittente de consistance plus ou moins liquide, un amaigrissement rapide et une déshydratation. En raison de la levée d'hypobiose des L4, les primipares peuvent présenter une forme clinique similaire lors de la mise à l'herbe dès la sortie de l'hiver (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

Dans le cadre des infestations par *H. contortus*, sont décrites une anémie sévère d'installation rapide et une hypoalbuminémie. Chaque parasite adulte détourne environ 0,05 mL de sang par jour, donc une infestation par 5000 *H. contortus* adultes engendre une perte sanguine de 250 mL par jour. L'hypoalbuminémie se traduit fréquemment par des œdèmes des membres et de l'auge ou « bottle-jaw » (Roeber, Jex, Gasser 2013a). En revanche, une diarrhée n'est que rarement observée. Ces infestations sévères, sur une courte durée, peuvent parfois entraîner la mort des animaux les plus sensibles.

- La plupart du temps, les ovins sont exposés continuellement à de faibles doses de parasites. Les strongyloses chroniques présentent alors une forme sub-clinique pouvant passer inaperçue aux yeux de l'éleveur. Les symptômes relatifs à la malabsorption sont des baisses de production, une diminution du gain moyen quotidien (GMQ) attendu, voire une perte de poids et des retards de croissance (Mavrot, Hertzberg, Torgerson 2015). Lors d'infestation chronique par *H. contortus*, l'anémie se met en place progressivement et ne devient clinique que très tardivement.

## 2.3. Physiopathogénie

### 2.3.1. Mécanismes physiopathologiques à l'échelle tissulaire

Les actions pathogènes des SGI au sein du tube digestif de l'hôte sont d'origines multiples : traumatiques, chimiques, spoliatrices et antigéniques (Lefèvre, Blancou, Chermette 2003).

- *Action traumatique*

Certains SGI possèdent des structures anatomiques spécialisées capables d'infliger des traumatismes aux muqueuses digestives. *H. contortus* présente une néoformation dentale (située au fond de la capsule buccale) qui permet la ponction des vaisseaux sanguins de la lamina propria de la muqueuse abomasale, tandis que les genres *Chabertia* et *Oesophagostomum* dilacèrent les tissus à l'aide de leur capsule buccale développée. Les strongles chymivores, de part un contact étroit entre leurs cuticules et les villosités intestinales, sont responsables d'une abrasion tissulaire, donc d'une altération des villosités. De plus, pour toutes les espèces, la migration de L4 dans les muqueuses digestives entraîne une disjonction des assises cellulaires et la disparition des cryptes glandulaires.

- *Action chimique*

Les lésions tissulaires observées résultent grandement de l'action chimique des produits d'excrétion-sécrétion des SGI : mucopolysaccharides, prostanoïdes, lipides, peptides, protéines. Ces substances variées contribuent à assurer le développement, la survie et la reproduction du parasite chez son hôte

Chez *H. contortus*, les cystéines protéases sont des enzymes jouant un rôle majeur dans la nutrition et l'invasion tissulaire. Elles provoquent une dégradation des composants du tissu conjonctif comme l'élastine et le collagène, et facilitent ainsi l'accès des parasites aux vaisseaux sanguins. D'autres cystéines protéases assurent la dégradation de l'hémoglobine, du fibrinogène et du plasminogène, combinées à l'action des phospholipases C et des peptidases qui permettent la lyse cellulaire et la digestion des protéines sanguines.

En fonction du stade parasitaire, les quantités et la nature des protéases diffèrent. Ceci est particulièrement vrai pour *T. circumcincta* qui est histophage au stade larvaire et hématophage à l'état adulte : l'activité protéasique est due à une cystéine protéase chez les L3, à une sérine protéase chez les L4 et à une métallo-protéase chez les adultes. Cette diversité des produits d'excrétion-sécrétion en fonction du stade reflète bien l'adaptation des SGI à la diversité des environnements durant leur développement (Hoste, Huby, Mallet 1997), et permet également d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

- *Action spoliatrice*

L'action spoliatrice est majeure pour *H. contortus* et, dans une moindre mesure, pour *T. circumcincta*. Les protéases secrétées par les parasites hématophages ont des propriétés anesthésiques, anticoagulantes et thrombolytiques, responsables de saignements digestifs. L'acétylcholinestérase, produit par la plupart des trichostrongles à l'exception d'*H. contortus*, inhiberait l'agrégation plaquettaire mais son implication est inférieure à celle des protéases (Hoste, Huby, Mallet 1997).

Les saignements digestifs chroniques aboutissent à une diminution significative des réserves en fer de l'organisme, d'où une incapacité, à long-terme, à régénérer l'anémie (Lefèvre, Blancou, Chermette 2003).

- *Action antigénique*

Chez les animaux non naïfs, le dégainement des larves L3 et des mues successives est à l'origine d'une forte réaction antigénique de la part de l'hôte. Elle consiste en une dégranulation des mastocytes de la *lamina propria* aboutissant à la libération d'amine toxique et à la production de mucus (hypersensibilité de type 1). Cette réaction inflammatoire immédiate permet parfois l'expulsion des parasites mais s'accompagne aussi de manifestations diarrhéiques.

Les SGI ont développé des stratégies variées pour contourner la réponse immunitaire de l'hôte, notamment via les produits d'excrétion-sécrétion. Il a été décrit chez *Teladorsagia* une activité *super oxyde dismutase* qui neutraliserait l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), radical libre impliqué dans l'élimination des parasites. Entre autre, la sécrétion d'acétylcholinestérase

réduirait la réaction inflammatoire par inhibition de la libération d'enzymes lysosomales lors de phagocytose. Pour finir, les prostanoïdes synthétisés par certaines espèces (*T. colubriformis*), comme la thromboxane, réduiraient la libération d'histamine par les mastocytes (Hoste, Huby, Mallet 1997).

### 2.3.2. Mécanismes physiopathologiques à l'échelle de l'organisme

La conjugaison d'une diminution de l'appétit, du phénomène de malabsorption et des modifications du métabolisme sont à l'origine des retards de croissance et des baisses de production fréquemment observés lors de strongylose (Hoste, Huby, Mallet 1997).

- *Diminution de l'appétit*

Une réduction de la quantité d'aliment ingérée est fréquemment observée lors d'infestation par les SGI. Cette baisse d'appétit est progressive et semble corrélée au nombre de parasites présents dans le tractus digestif des ruminants. Les mécanismes physiopathologiques sont encore méconnus mais pourraient impliquer certaines enzymes gastro-intestinales (gastrine, cholécystokinine) agissant sur le centre de la satiété, dont les sécrétions seraient augmentées en cas de parasitose.

La sous-consommation engendrée par les strongyloses est en partie compensée par un tri des aliments ingérés, ceux à concentration protéique élevée étant privilégiés.

- *Malabsorption*

Comme décrit précédemment, les infestations de SGI entraînent des lésions tissulaires des muqueuses de l'abomasum et de l'intestin à l'origine d'une malabsorption :

- Dans la caillette, la disparition des cryptes glandulaires provoque une diminution du nombre de cellules pariétales sécrétrices d'HCl. Il en résulte une augmentation du pH gastrique perturbant le fonctionnement de nombreuses enzymes impliquées dans la digestion (pepsine, trypsine).

- Dans l'intestin grêle, l'altération de la bordure en brosse des entérocytes entraîne une diminution de la surface de contact entre les nutriments et les enzymes digestives



terminales, à l'origine d'une déplétion de l'activité enzymatique. Le temps de contact de ces nutriments avec les villosités intestinales est également diminué en raison de perturbations de la motricité digestive. Enfin, les lésions tissulaires et cellulaires provoquent une fuite plasmatique digestive en raison d'une perméabilité épithéliale accrue.

- *Modification du métabolisme*

Lors de strongyloses, la destruction tissulaire et les pertes protéiques digestives mettent à contribution le métabolisme, dont la priorité est de maintenir l'intégrité du tractus digestif et l'homéostasie sanguine. Ainsi, l'anabolisme protéique est fortement accru dans le foie et les épithéliums lésés, au détriment des sites de production périphériques (muscles striés, tissus adipeux, mamelle, follicules pileux).

#### 2.4. Conséquences économiques des strongyloses

Les principales pertes économiques dont sont responsables les strongyloses, concernent le GMQ moyen, la production laitière et la production de laine. Lors d'une méta-analyse sur 218 études, publiée en 2015 par Mavrot *et al.*, 85% des études rapportent un effet négatif des strongyloses sur les productions. Par rapport à des animaux sains, les animaux infestés par les SGI présentent une diminution du GMQ de 23% en moyenne, tandis que les productions laitières et de laine sont diminuées respectivement de 22% et 10%.

Si les traitements anthelminthiques permettent d'améliorer la production laitière de 19% à 44% par rapport aux animaux infestés non traités (Cringoli et al. 2008), ils génèrent des frais supplémentaires aux éleveurs, ce qui majore le manque à gagner.

### **3. Le diagnostic des strongyloses**

#### 3.1. Indicateurs cliniques

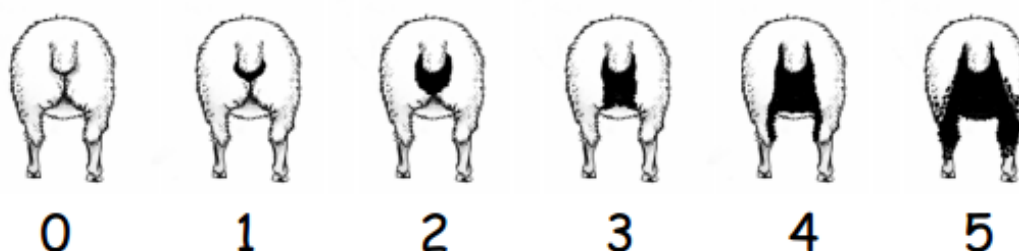
##### 3.1.1. NEC et variation du GMQ

La Note d'Etat Corporel est un outil zootechnique permettant à l'éleveur ou au vétérinaire d'évaluer la couverture grasseuse en région dorso-lombaire de l'animal, ainsi que l'épaisseur des muscles sous-lombaires. La grille de notation comprend des notes allant de 1 à 5, la note 1 étant attribuée à un animal très maigre et la note 5 à un animal obèse. La détermination de la NEC s'effectue principalement par la palpation des apophyses épineuses et transverses des vertèbres lombaires, et par la palpation des muscles sous-lombaires (Adjou 2013, voir annexe 1). Cet outil permet d'apprécier une fonte grasseuse et musculaire mais est très peu spécifique des strongyloses, car de nombreuses pathologies d'élevage provoquent un amaigrissement chronique. C'est de plus un outil opérateur-dépendant du fait de la subjectivité de la notation. Cependant, une diminution de la NEC, associée à un GMQ en dessous des attentes, voire une perte de poids, doivent conduire à suspecter une strongylose sub-clinique.

##### 3.1.2. Index de souillure de l'arrière train (*Dag-Score*) et consistance des fécès (index DISCO)

Le Dag-Score est un index défini par Larsen et *al.* en 1995, permettant d'apprécier le degré de souillure de l'arrière train des ovins par de la diarrhée. De même que la NEC, une grille de notation permet d'attribuer 6 notes selon l'étendue des souillures. L'utilisation du Dag-Score repose sur le postulat que les notes sont plus élevées en cas de parasitisme digestif.

Figure 4 : Echelle de notation du Dag-Score (Bonnefont, Canellas 2014)



Parfois utilisé pour aider au dépistage des strongyloses gastro-intestinales (Jacquet, Canellas, et al. 2014), l'index doit être utilisé avec précaution et confronté à d'autres éléments de suspicion. En effet, cet index de souillure de l'arrière train présente plusieurs inconvénients :

- L'observation de traces de souillures ne renseigne pas sur le caractère présent ou passé de l'affection.

- La diarrhée est un symptôme qui n'est ni sensible ni spécifique de parasitisme. Des facteurs favorisant un ramollissement des selles peuvent en être responsables, comme une transition alimentaire trop rapide ou une ration trop riche en concentré et/ou en azote. En outre, les infestations par *H. contortus* provoquent très rarement une diarrhée.

- L'accrochage de fèces au poil dépend de l'animal (longueur et densité du poil) et de la conduite d'élevage (propreté des lieux de couchage).

- Dans le cas de strongyloses gastro-intestinales, il a été démontré qu'il n'existe pas de corrélation entre la note du Dag-Score et l'intensité de l'excrétion fécale d'œufs de strongles (Bonfont, Canellas 2014). Cet index ne permet donc pas d'estimer le niveau d'infestation de l'animal.

L'index DISCO, élaboré par Cabaret et al. en 2006, attribue un score à la consistance des fèces :

- La note 1 est attribuée aux fèces d'aspects normaux, en « pellets », soit 40% MS.
- La note 2 est attribuée aux fèces mous, d'aspect « bouse de vache », soit 26% MS.
- La note 3 est attribuée aux fèces semi-liquides retrouvées lors de diarrhée, soit 16% MS.

Il a été montré qu'un score DISCO égal à 3 est bien corrélé à la présence de larves en grande quantité dans le tractus digestif d'agneaux, dans les régions où *T. circumcincta* et *T. colubriformis* sont prédominants (Cabaret et al. 2006). De plus, ce score est également corrélé à l'intensité de l'excrétion fécale pour environ 80% des animaux (Bentounsi, Meradi, Cabaret 2012).

Cet indicateur clinique semble donc intéressant mais reste encore peu utilisé en routine en raison de plusieurs inconvénients :

- Les diarrhées peuvent être provoquées par d'autres parasites que les SGI (coccidies, *Moniezia*) et par d'autres facteurs évoqués ci-dessus.
- La méthode nécessite des prélèvements individuels fastidieux, et l'ampoule rectale n'est pas toujours pleine au moment du prélèvement.
- Cet index est inopérant dans les régions chaudes et humides où *H. contortus* est le strongle prédominant (Bentounsi, Meradi, Cabaret 2012).

### 3.1.3. Méthode FAMACHA®

La méthode FAMACHA® est une technique d'évaluation visuelle du degré d'anémie des ovins infestés par *H. contortus*. Cet outil, développé en Afrique du Sud, utilise la couleur des muqueuses oculaires comme indicateur de la sévérité de l'anémie (Van Wyk, Bath 2002). Il est aujourd'hui utilisé dans de nombreuses régions à climat chaud et humide comme au Brésil, dans le sud des Etats-Unis ou en Guadeloupe (Van Wyk et al. 2006), mais son utilisation dans les pays à climat tempérée reste controversée.

La grille de notation comprend 5 notes, la note 1 étant attribuée à des muqueuses rouges et la note 5 à de muqueuses blanches (voir annexe 2). Il a été montré l'existence d'une corrélation entre la note de la muqueuse oculaire et l'hématocrite de l'animal (Fondraz 2012).

Tableau 2 : Corrélation entre la note FAMACHA et l'hématocrite (d'après Fondraz 2012).

Note FAMACHA	Hématocrite (Ht)
1	Ht > 28
2	23 < Ht < 27
3	18 < Ht < 22
4	13 < Ht < 17
5	Ht < 12

A l'origine, ce système a été développé en raison de l'émergence de résistances aux anthelminthiques, afin d'instaurer des traitements sélectifs : il est préconisé de traiter seulement les animaux présentant une forte anémie (note de 4 et 5), afin de laisser des hôtes « refuges » (voir partie 2, 3.1.1.) pour les parasites sensibles (Van Wyk, Bath 2002). En France, en raison du poly-parasitisme, la méthode FAMACHA est seulement utilisée pour aider au dépistage de l'haemonchose (Jacquiet, Canellas, et al. 2014).

Le principal inconvénient de cette méthode est son manque de sensibilité. Les ovins anémiés sont plus facilement détectés lorsque la coloration de leurs muqueuses atteint les scores de 4 et 5, mais l'hématocrite est à ce moment déjà très bas (inférieur à 17%). La suspicion d'haemonchose est donc émise tardivement. La spécificité est également moyenne car d'autres maladies parasitaires, comme la fasciolose ou des maladies transmises par les tiques (babésiose et anaplasmose à *Anaplasma ovis*), peuvent provoquer une anémie.

Des indicateurs zootechniques et cliniques présentés ici, aucun n'est assez sensible ni assez spécifique pour permettre un diagnostic de strongylose. Celui-ci passe alors obligatoirement par des méthodes de laboratoire.

## 3.2. Diagnostic de laboratoire

### 3.2.1. Coproscopies quantitatives

La coproscopie regroupe l'ensemble des techniques permettant de rechercher macroscopiquement ou microscopiquement des éléments parasitaires au sein des matières fécales. Ces éléments peuvent être des œufs et larves d'helminthes, des protozoaires, des champignons voire des arthropodes (Beugnet, Polack, Dang 2004).

L'identification d'œufs ou larves de strongles dans les matières fécales constitue la base du diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ovins. Les coproscopies peuvent être qualitatives (seule la mise en évidence d'éléments parasitaires dans les fèces et leur identification importe au praticien), ou quantitatives (l'objectif est de dénombrer le nombre moyen d'éléments parasitaires par gramme de fèces). Pour le diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ruminants, la méthode quantitative est la seule utilisable car les contaminations par les SGI sont extrêmement fréquentes (Kerboeuf, Hubert, Hoste 1997).

- *Réalisation et conservation des prélèvements*

Idéalement, le prélèvement de matières fécales s'effectue dans le rectum de l'animal pour éviter les contaminations au sol. Les prélèvements sont identifiés et conditionnés individuellement. Une dizaine de gramme par animal est nécessaire pour la réalisation des coproscopies et des coprocultures (voir 3.2.2.).

Si possible, les prélèvements sont examinés rapidement après la récolte. Dans le cas contraire, il est possible de les conserver au réfrigérateur à + 4°C. La congélation est à éviter car elle peut provoquer l'éclatement des œufs et interdit par la suite la réalisation de coprocultures.

Un premier examen macroscopique des fèces est intéressant pour apprécier leur consistance, leur coloration (présence de méléna ou sang en nature) et la présence d'éléments figurés (aliments non digérés, mucus, parasites adultes ou segments de cestodes).

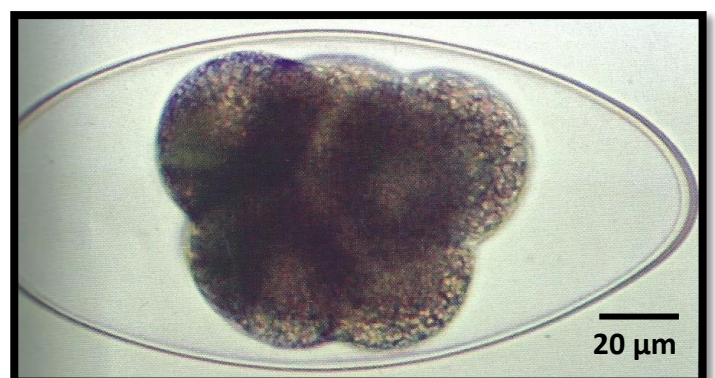
- *Examen microscopique des prélèvements*

Les œufs de SGI mesurent entre 60 µm et 200 µm de long. Ils présentent une mince coque ovale contenant une morula avec un nombre de blastomères différent selon l'espèce et le stade d'embryonnement.

La coproscopie ne permet pas de distinguer les genres de strongles gastro-intestinaux car les morphologies des œufs sont semblables. Seuls les œufs de *Nematodirus* peuvent être identifiés, en raison de leur grande taille (150-200 x 70-120 µm) et de leurs volumineux blastomères centraux (Brard, Chartier 1997).

Figure 5 : Morphologie des principaux œufs de strongles gastro-intestinaux au microscope optique x400 (crédit photo : Service de Parasitologie ENVA).

Noter la différence de morphologie entre un œuf de genre indéterminé (à gauche) et un œuf du genre *Nematodirus* (à droite).



Pour l'examen microscopique, les prélèvements nécessitent un enrichissement afin de faciliter la recherche et le dénombrement des œufs. Il existe 2 méthodes (Beugnet, Polack, Dang 2004, Lefèvre, Blancou, Chermette 2003).

- Enrichissement par sédimentation : le principe de cette méthode est de diluer le prélèvement dans une solution aqueuse de densité faible afin de concentrer les éléments parasitaires, de densité supérieure, dans le culot du tube.

Cette méthode qualitative est intéressante pour la recherche d'œufs de trématodes, mais n'est pas utilisée pour le diagnostic des strongyloses.

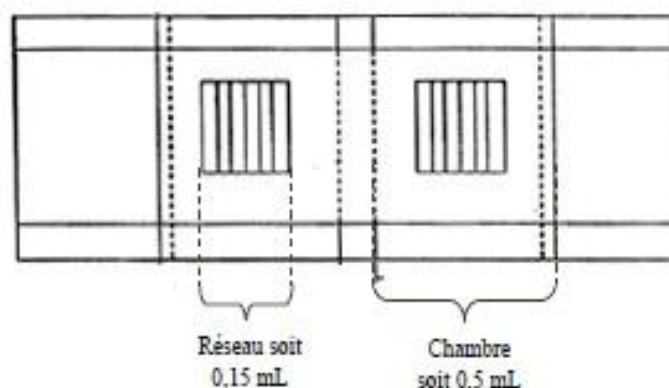
- *Enrichissement par flottation* : le principe est de diluer le prélèvement dans une solution de densité élevée afin de concentrer les éléments parasitaires, de densité inférieure, à la surface du liquide de flottation.

Une méthode quantitative basée sur l'enrichissement par flottation a été développée par MacMaster, puis modifiée par Raynaud (Raynaud 1970). Cette méthode est aujourd'hui largement utilisée pour le dépistage des strongyloses et pour la quantification du nombre d'œufs de SGI par gramme de fèces.

*Méthode de flottation de MacMaster modifiée par Raynaud :*

- 3 g de matière fécale sont broyés dans un mortier puis dilués dans 42 mL d'une solution saturée en NaCl (400 g de sel dans 1 L d'eau,  $d = 1,2$ ). Le mélange est filtré 3 fois au travers d'une passoire à thé, puis le filtrat est homogénéisé. Par la suite, un aliquote est prélevé et chargé dans les 2 chambres d'une lame de Mac Master (figure 6). Les œufs sont moins denses que le liquide de flottation ; ils vont donc se collecter à la surface de la lame en 5 minutes environ. La lame peut ensuite être observée au microscope optique à l'objectif x10 ou x40.

Figure 6 : Schéma d'une lame de Mac Master



Le volume total des deux réseaux est de 0,3 mL. Comme le volume du prélèvement d'origine est de 42 mL, il faut convertir le nombre d'œufs comptés dans les 0,3 mL.

42 mL = 150 x 0,3 mL, donc un œuf compté dans les deux réseaux équivaut à 150 œufs présents dans le prélèvement de 3 g (42 mL).

Chaque œuf compté dans les deux réseaux correspond donc à 150 œufs pour 3 grammes soit 50 opg. On considère donc que :

- $N_{OPG} = 50 \times \sum_{2 \text{ réseaux}} \text{œuf}$
- Si des œufs sont présents seulement en dehors des réseaux, on considère que  $N_{OPG} = 15$ .

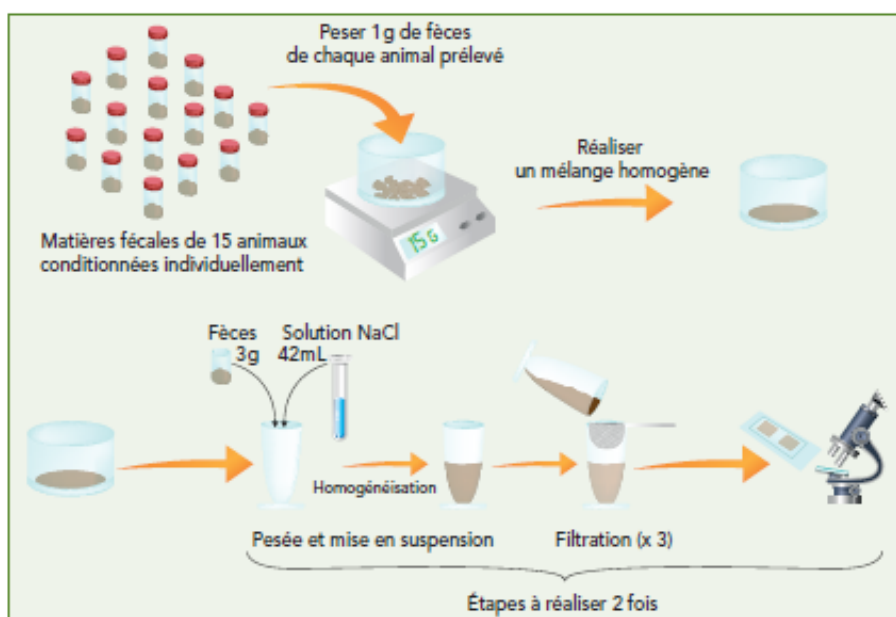
Lors du dépistage des strongyloses à l'échelle d'un troupeau, il est inenvisageable de réaliser des coproscopies quantitatives sur tous les individus, en raison des coûts générés par ces analyses (entre 8 et 12 euros pour une analyse individuelle selon les laboratoires d'analyse). On procède donc par échantillonnage dans un lot dont on souhaite déterminer l'intensité moyenne de l'excrétion fécale.

Il est recommandé de réaliser 15 prélèvements individuels dans le lot à tester. En raison de l'agrégation parasitaire, un nombre de prélèvements inférieur à 10 pourrait conduire à une sous-estimation ou à une surestimation de l'excrétion fécale du lot (Jacquiet, Canellas, et al. 2014).

Par la suite, les coproscopies peuvent être effectuées après avoir mélangé de manière homogène les matières fécales des 15 individus (voir figure 7). Il a été montré une très forte corrélation ( $r = 0,98$ ) entre les moyennes de 15 valeurs individuelles d'excrétion fécale et la moyenne de 2 valeurs obtenue après mélange des 15 prélèvements à tester (Morgan et al. 2005, Bonnefont, Canellas 2014, Jacquiet et al. 2014).



Figure 7 : Principe de la coproscopie de mélange (d'après Bonnefont et Canellas, 2014)



- *Interprétation des coproscopies*

L'interprétation des coproscopies quantitatives est délicate en raison de nombreux facteurs influençant l'excrétion fécale des œufs de SGI :

- La prolificité de l'espèce parasitaire : 5000 œufs pondus par jour par une seule femelle de l'espèce *H. contortus*, 200 œufs pour une femelle des espèces *T. circumcincta* et *T. colubriformis* et 50 œufs seulement pour une femelle de *N. battus*.

- Le statut physiologique de l'hôte : phénomène de *Periparturient Rise*.

- Le poids de l'animal : les animaux de race légère produisent moins de fèces donc le comptage est surestimé.

- Le niveau d'infestation : la prolificité par femelle de *T. circumcincta* est inversement proportionnelle à la densité des adultes de cette espèce dans le tube digestif de l'hôte (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

- La consistance des fèces : lors de diarrhée, le poids de l'eau n'est pas pris en compte et conduit à une sous-évaluation du comptage par dilution (Le Jambre et al. 2007).

- L'âge de l'animal : développement d'une immunité acquise chez les individus adultes (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

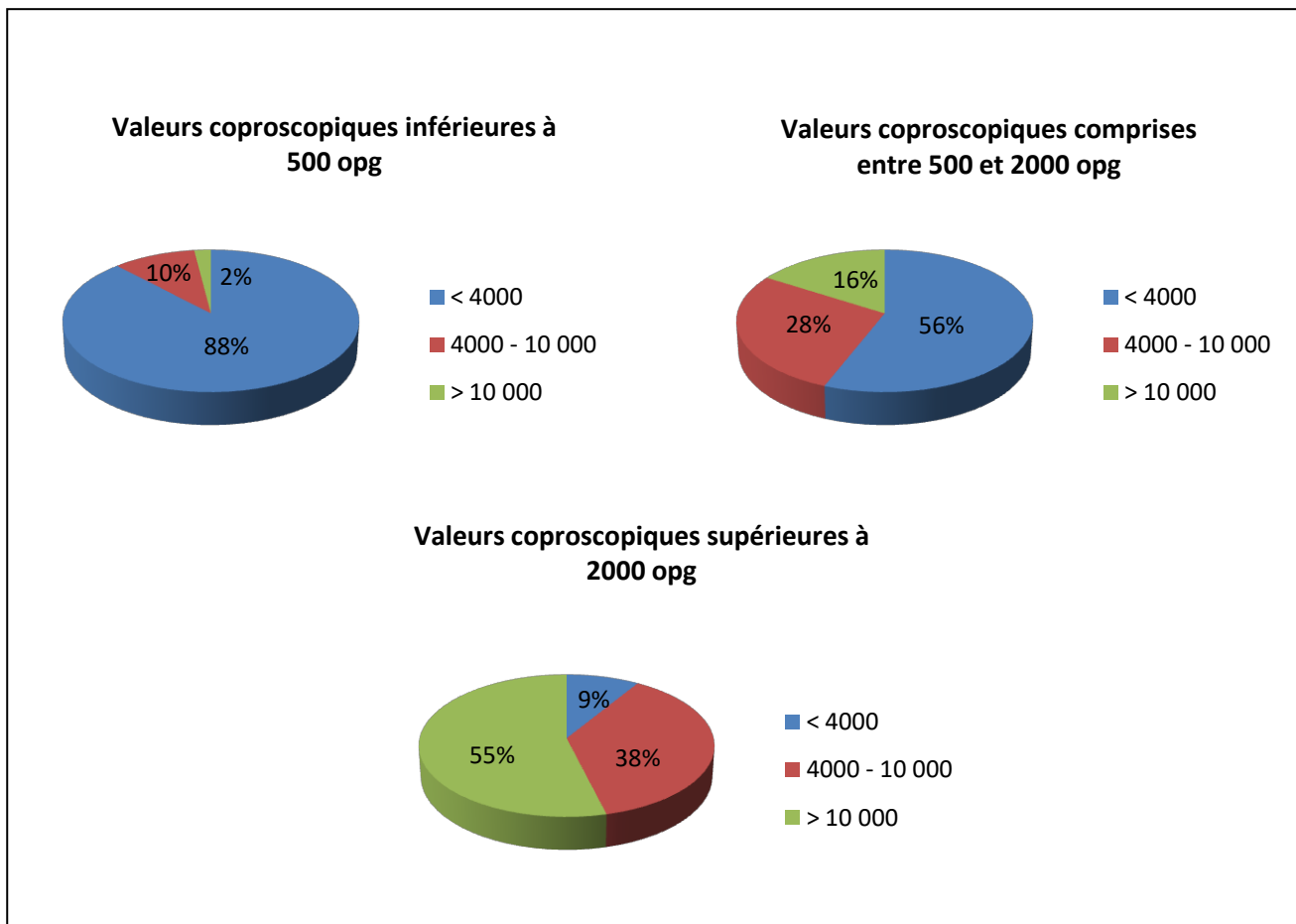
En dépit de ces facteurs de variations, une assez bonne corrélation entre l'intensité de l'excrétion fécale et la charge parasitaire a été établie chez les jeunes ovins (McKenna 1985, voir figure 8). L'existence de cette corrélation chez les adultes est controversée selon les études, mais l'une d'elle a montré que l'âge des animaux infestés ne modifie pas de manière significative le lien entre l'excrétion fécale et la charge parasitaire (Cabaret, Gasnier, Jacquet 1998).

Dans son article publié en 1985, McKenna a défini trois niveaux d'infestation : bas (< 4000 adultes), modéré (4000 - 10 000 adultes) et élevé (> 10 000 adultes). Cet auteur a par la suite étudié la correspondance entre le nombre de vers adultes présents dans le tube digestif et l'intensité de l'excrétion d'œufs dans les matières fécales. Les fortes excrétions sont associées à des infestations importantes (Figure 8). Cependant, une intensité d'excrétion d'œufs inférieure à 500 opg ne permet pas d'exclure complètement des conséquences pathologiques d'une infestation : celle-ci peut être due à des larves immatures ou à des espèces peu prolifiques, et la ponte peut être momentanément interrompue au moment du prélèvement.

Tableau 3 : Charges parasitaires entraînant des conséquences cliniques sévères chez les ovins (d'après Brard, Chartier 1997)

Organe	Espèce	Charge parasitaire (vers adultes)
Caillette	<i>Haemonchus contortus</i>	4000
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	10 000
	<i>Trichostrongylus axei</i>	25 000 - 40 000
Intestin grêle	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	20 000 - 50 000
	<i>Nematodirus spp</i>	1000 (agneaux)

Figure 8 : Relation entre l'excrétion fécale et la charge parasitaire chez les ovins (d'après McKenna 1985).



De manière générale, il est toujours nécessaire d'interpréter les valeurs d'excrétion fécale en relation avec le contexte épidémioclinique et la conduite d'élevage.

Il n'y a pas de consensus concernant le niveau d'excrétion d'œufs à partir duquel la mise en place d'un traitement anthelminthique apparaît nécessaire. On peut tout de même considérer que les animaux excréant moins de 500 opg, en l'absence de signe clinique de strongylose, ne nécessitent pas de traitement, tandis que ceux excréant plus de 1000 opg doivent être traités. Pour des valeurs d'excrétion comprises entre 500 et 1000 opg, il est nécessaire de prendre en compte les indicateurs zootechniques et la conduite d'élevage. Il convient à l'éleveur et au praticien de repérer et de traiter les lots d'animaux présentant un risque, comme la proximité du part, ou les individus les moins résilients. La résilience est la capacité d'un individu à maintenir son niveau de production malgré une infestation parasitaire (Kerboeuf, Hubert, Hoste 1997, Jacquet, Canellas, et al. 2014).

### 3.2.2. Coprocultures de mélange

La culture larvaire, ou coproculture, consiste à incuber des matières fécales contenant des œufs de SGI dans un milieu propice afin de faire éclore ces œufs en L1, puis de faire se développer les L1 jusqu'au stade L3. Ces dernières sont ensuite examinées au microscope optique afin de déterminer les espèces de SGI présentes dans les matières fécales, en utilisant des critères morphologiques et morphométriques. Comme expliqué précédemment, la coproscopie ne permet pas de différencier les espèces de SGI responsables de l'infestation, les œufs excrétés étant semblables. Seules les larves L3 sont, en principe, identifiables par un helminthologue confirmé et permettent de définir le profil des infestations parasite des ovins.

- *Extraction des larves L3*

De nombreux protocoles de coprocultures ont été publiés dans la littérature. Ceux-ci varient selon la durée ou la température d'incubation, et selon la méthode utilisée pour récupérer les larves infestantes L3. En effet, il a été vu précédemment que, dans les conditions naturelles, le développement des L3 nécessite des conditions de température et d'humidité spécifiques pour chaque espèce de SGI. On comprend donc aisément que, dans le cadre de poly-parasitisme, le développement des cultures larvaires de certaines espèces sera favorisé pour un couple température/humidité fixé (Dobson et al. 1992). Le protocole est déterminé en fonction du contexte épidémiologique et de l'espèce de SGI recherchée majoritairement, mais une incubation à 25°C - 27°C pendant 7 jours convient pour la plupart des espèces (Roeber, Jex, Gasser 2013b).

La méthode historique de référence pour l'extraction des larves L3 est la méthode de Baermann (Kerboeuf, Hubert, Hoste 1997). Cependant, il sera détaillé ici le protocole utilisé par Roeber et *al.* lors d'une étude visant à comparer les méthodes moléculaires et les méthodes classiques pour l'identification des espèces de SGI (Roeber, Larsen, et al. 2012). Ce protocole est celui utilisé lors de l'étude expérimentale relatée dans la 3<sup>ème</sup> partie de cette thèse.

### *Protocole de Baermann modifié (MAFF 1986)*

- Les principes de prélèvements des échantillons sont les mêmes que pour les coproscopies. Les matières fécales de chaque animal du lot à tester sont prélevées dans le rectum, puis 3g de chaque échantillon sont mélangés dans un pot en plastique. En pratique, pour chaque échantillon, la moitié d'un prélèvement est destinée au coproscopies de mélange et l'autre est utilisée pour les coprocultures (Jacquet, Canellas, et al. 2014)

- Les cultures sont incubées à 25°C pendant 10 jours, sans avoir été mises au frais préalablement. Les pots sont ouverts pour permettre une oxygénation permanente. L'humidité du mélange est contrôlée tous les 2 à 3 jours et ajustée à l'aide d'une pipette d'eau.

- Après 10 jours d'incubation, le pot est rempli d'eau jusqu'au bord. Une boîte de Pétri est apposée à l'envers sur le pot, puis l'ensemble est retourné sur la table. La boîte de Pétri est alors remplie d'eau avec une pipette au deux tiers de sa hauteur.

- En 24h environ, les larves L3 vont s'extraire de la gangue fécale et, attirées par la lumière, vont migrer dans le liquide contenu dans la boîte de Pétri.

- Les L3 sont alors récoltées dans un tube à essai par aspiration du liquide à l'aide d'une pipette, et le tube est centrifugé à 4500 tours par minutes pendant 10 minutes. Le culot du tube concentrant les L3 peut alors être prélevé et analysé.

- *Identification morphologique des L3*

Même pour un helminthologue confirmé, l'identification morphologique des larves L3 reste difficile. Les principaux critères de diagnose utilisés dans la littérature sont la longueur totale de la larve, le nombre de cellules intestinales, la forme des extrémités craniales et caudales de la larve et la longueur de l'extension caudale de la gaine. De nombreuses clés de détermination ont été proposées (Dikmans, Andrews 1933, MAFF 1986). Celle décrite ici a été élaborée par Van Wyk en 2004 puis reprise et complétée par Van Wyk et Mayhew en 2013.

La méthode dite de « Van Wyk » consiste à comparer la longueur de l'extension caudale de la gaine des différentes espèces à celle de *T. colubriformis* pour les identifier. Cette clé de détermination pratique et novatrice ne permet pas d'effectuer la différence

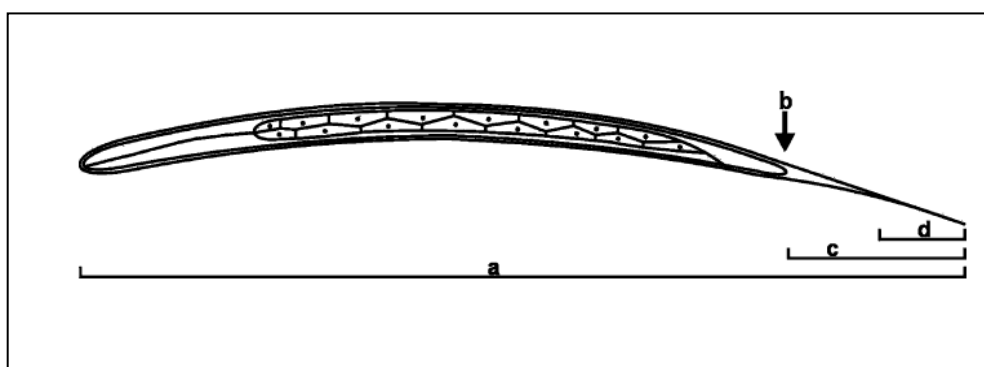
entre les L3 de *T.circumcincta* et *T. colubriformis* de manière certaine, ce qui constitue son principal inconvénient. En effet, ces deux espèces sont fréquemment retrouvées en association dans les biotopes tempérés, froids et secs (Roeber, Jex, Gasser 2013).

- *Préparation des larves* : le comptage des larves L3 s'effectue usuellement sur 100 larves. Les larves sont tuées par l'action conjuguée d'une solution de formaldéhyde à 2% et d'un chauffage à 55°C pendant 1 minute. Ce procédé permet une très bonne conservation post-mortem des caractéristiques morphologiques des larves. 40 µL du culot centrifugé précédemment est prélevé et déposé sur une lame porte-objet, puis une goutte d'une solution de Lugol est ajoutée sur la lame.

- *Identification des larves* : L'identification morphologique des L3 est principalement basée sur la longueur de l'extension caudale de la gaine, ou « *Sheath Tail Extension* » (voir figure 9). La référence, notée « X », est la longueur du STE de *T. colubriformis*, soit 33 µm. Ainsi, les longueurs de STE de chaque espèce sont évaluées en fonction de « X ». Pour affiner la diagnose, il est également défini une valeur « F », qui représente la proportion de la longueur du filament dans la longueur du STE.

De cette manière, chaque L3 de SGI est caractérisée par un facteur de « X », ou « *X-value* », et par la valeur de « F ».

Figure 9 : Morphologie générale d'une larve L3 de nématode, avec (a) : longueur totale, (b) : type d'extrémité caudale, (c) : extension caudale de la gaine (STE) et (d) : taille du filament.



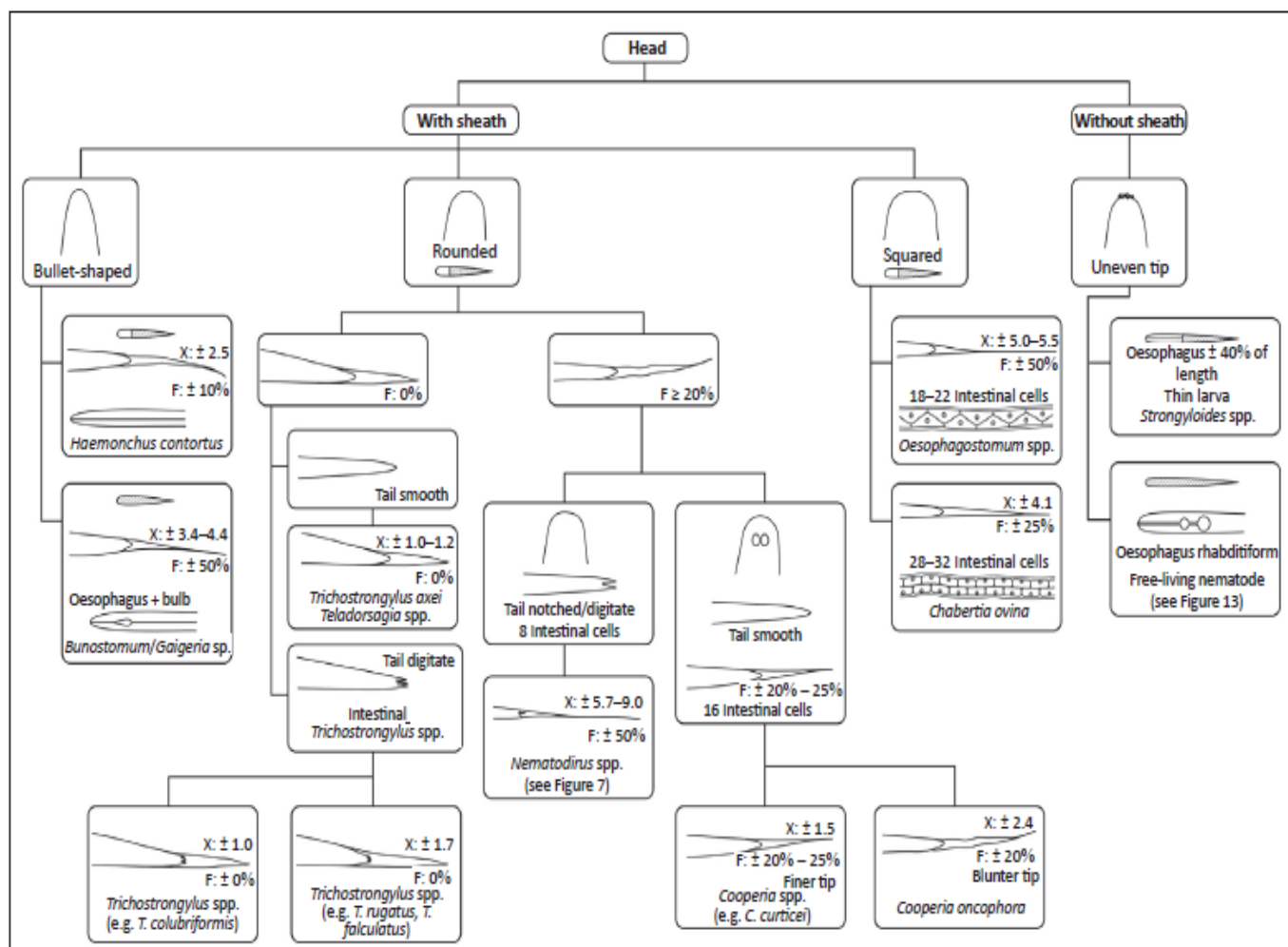
A titre d'exemple :

- *T. colubriformis* : X-value = 1, F = 0 % (absence de filament)
- *H. contortus* : X-value = 2,5, F = 10 % (le STE de *H. contortus* est 2,5 fois plus grand que celui de *T. colubriformis* ; la longueur du filament représente 10% de la longueur du STE)

Les larves sont observées au microscope au grossissement x100 et les STE sont comparées à l'aide d'un micromètre. Il est recommandé de calibrer le réticule du micromètre de telle manière que 4 divisions représentent 33 µm. Ainsi, il est possible d'évaluer rapidement et simplement à l'aide du réticule la valeur du « X-value » et de « F » pour chaque larve comptée.

La clé de détermination des espèces selon cette méthode est illustrée par la figure 10, tandis que les tailles et détails morphologiques de chaque espèce sont annexés en fin de document (annexe 3).

**Figure 10** : Clé de détermination des principales espèces de strongles gastro-intestinaux des ovins, sur la base de critères morphologiques (d'après Van Wyk, Mayhew 2013)



Cette méthode, bien que relativement simple à mettre en œuvre et fiable, reste longue et fastidieuse. De plus, la qualité de l'identification dépend largement des compétences et de l'expérience de l'opérateur. Le développement actuel d'outils moléculaires et génétiques ouvre la voie à des alternatives efficaces au dénombrement manuel et à l'identification morphologique des L3 de strongles gastro-intestinaux.

- *Interprétation des coprocultures*

Comme évoqué précédemment, les conditions expérimentales d'incubation fixées favorisent le développement de certaines espèces au dépend des autres dans le mélange. De plus, en 1992, Dobson et *al.* ont montré qu'expérimentalement, le taux de développement des œufs en L3 avoisine les 60% pour *T.colubriformis*, alors qu'il n'est seulement que de 39% pour *T. circumcincta*, et ce quelques soient les conditions d'incubation. Il est ainsi admis que lors de poly-parasitisme, les proportions de L3 de chaque espèce après coprocultures soient différentes des proportions d'œufs respectives dans le mélange initial.

Ainsi, la coproculture et l'identification morphologique ne permettent pas d'estimer précisément les proportions des différentes espèces de SGI au sein d'un hôte poly-parasité, mais apportent une indication intéressante concernant les espèces parasitaires présentes dans le tube digestif de l'animal (Roerber, Jex, Gasser 2013).

### 3.2.3. Identification moléculaire par *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR)

De nouveaux outils moléculaires sont actuellement développés dans le but de s'affranchir des méthodes diagnostiques conventionnelles et de leurs limites présentées précédemment : faible sensibilité et spécificité, mauvaise répétabilité des mesures et manipulations chronophages. Les méthodes actuelles basées sur l'amplification enzymatique de séquences d'ADN, comme la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), constituent une avancée majeure dans la compréhension de la biologie des SGI. Elles sont également très prometteuses concernant le diagnostic des strongyloses et la mise en évidence des résistances aux anthelminthiques.



- *Principe de l'amplification par PCR*

La méthode PCR permet l'amplification *in vitro* de séquences d'ADN spécifiques au sein d'un génome complet. Le processus entraîne la création de plusieurs millions de copies d'ADN à partir d'une séquence unique. Après extraction de l'ADN, il implique 3 phases successives :

- La dénaturation à haute température (95°C) de la double hélice d'ADN.
- L'hybridation sélective des amorces de nucléotides de part et d'autre de la séquence cible, aux extrémités 3' de chaque brin. Cette étape se déroule à une température ( $T_m$ ) inférieure, entre 45°C et 65°C suivant la longueur et la composition en base des amorces.
- L'élongation des brins d'ADN à partir des amorces, à l'aide d'une enzyme à activité ADN polymérase, à haute température (environ 70°C).

Ce cycle est répété plusieurs dizaines de fois, et chaque double brin formé sert de matrice par la suite : on a donc une amplification exponentielle de la séquence. Ainsi, de très faibles quantités d'ADN peuvent être détectées avec ce procédé.

La PCR quantitative (*qPCR*) est une adaptation de la méthode PCR classique et permet de suivre en temps réel l'intensité de l'amplification enzymatique grâce à l'émission de fluorescence. La technologie *TaqMan* est une des plus utilisée : une sonde spécifique *TaqMan* complémentaire d'une séquence interne entre les deux amorces est ajoutée. Un fluorochrome (*reporter*) est fixé à son extrémité 5' et un désactivateur (*quencher*) est fixé à l'extrémité 3'. Avant le début de l'élongation, la sonde est intacte et la fluorescence du *reporter* est absorbée par le *quencher*. Lors de la polymérisation, l'ADN polymérase hydrolyse la sonde lorsqu'elle arrive à sa hauteur, grâce à son activité exonucléase. Cette hydrolyse sépare le *quencher* et le *reporter*, la fluorescence n'est plus absorbée (Heissl, Arbeithuber, Tiemann-Boege 2017).

A la fin de la réaction de *qPCR*, l'intensité de la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN formée. Par la suite, à l'aide de gammes-étalon ou courbes standards, on détermine de manière précise le nombre de copies d'ADN présentes initialement dans le mélange.

- *Application en parasitologie*

Dans l'étude des strongyloses digestives, le principal intérêt de la *PCR* est la possibilité d'identifier précisément les espèces de SGI présentes dans les fèces, même en cas de très faibles quantités d'ADN. La séquence amplifiée par *qPCR* est le gène ITS-2 de l'ARNr des parasites. Cette séquence, qui mesure entre 364 et 522 paires de bases selon l'espèce, est spécifique d'une espèce de SGI, mais varie très peu d'un individu à l'autre au sein de cette espèce (Roeber, Jex, Gasser 2013b).

Roeber et *al.* ont montré en 2011 que la *qPCR* était un outil fiable pour la détection spécifique des œufs des principales espèces de SGI dans les fèces des ovins (*H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis*, *C. ovina*, *O. venulosum*). Parmi 470 échantillons de fèces dans lesquels des œufs de SGI ont été visualisés (contrôles positifs), 98% ont été considérés comme positifs par *qPCR*. 100% des contrôles négatifs (n=100) ont été identifiés comme tels par cette méthode. De plus, sur 53 échantillons considérés négatifs suite à des coproscopies classiques, 23 était positifs après amplification par *qPCR*.

Ainsi, la sensibilité de la méthode *PCR* est évaluée actuellement à 98% tandis que sa spécificité est de 100%. Son seuil de détection est également plus bas que les méthodes coprologiques classiques (environ 1 opg détecté contre 15 opg pour la méthode de MacMaster (Jacquiet, Canellas, et al. 2014)).

Les études menées par la suite ont mis en évidence les multiples avantages de la méthode *qPCR* :

- La méthode *qPCR-multiplex* permet l'identification précise et le dénombrement de plusieurs espèces de SGI au sein d'un mélange, de manière plus sensible et spécifique que les méthodes d'identification morphologiques (McNally et al. 2013).

- Associée au FECRT (voir 4.1.1.), la *qPCR* est plus intéressante que la coproculture dans l'évaluation des résistances aux anthelminthiques des SGI. Les espèces sont identifiées à partir de l'ADN des œufs, donc leurs proportions dans les matières fécales reflètent plus précisément l'helminthofaune de l'hôte (cf. 3.2.2.) (Roeber, Larsen, et al. 2012).

- L'automatisation de la méthode *qPCR* permet un gain de temps considérable par rapport à la méthode d'identification morphologique suites aux coprocultures (2h contre au moins une semaine). Ceci permettra à l'avenir de réaliser des études épidémiologiques à

grande échelle. Les manipulations gagnent également en répétabilité et peuvent être effectuées par un opérateur ayant peu de compétence en parasitologie (Roeber et al. 2012).

Aujourd'hui, bien que les avantages des technologies moléculaires soient indéniables, elles restent encore du ressort des laboratoires spécialisés, en France comme ailleurs. Leur démocratisation à l'avenir pourrait révolutionner le diagnostic et la prise en charge des strongyloses gastro-intestinales des ovins.

#### 3.2.4. Dosage du pepsinogène plasmatique

Le pepsinogène est une pro-enzyme sécrétée par les cellules du fundus de la caillette. Il est converti en sa forme active, la pepsine, par l'acide chlorhydrique produit par les cellules pariétales à HCl de la caillette. Lors de parasitisme de cet organe, les cryptes glandulaires sont détruites par les L4, ce qui entraîne une augmentation du pH abomasal et une altération des jonctions cellulaires (cf. 2.2.1.). Ainsi, le pepsinogène n'est plus converti en pepsine, s'accumule et fuit la caillette au travers des disjonctions cellulaires pour atteindre le courant sanguin.

Une augmentation de la concentration en pepsinogène plasmatique pourrait donc être révélatrice d'une destruction de la muqueuse glandulaire de la caillette, lors d'infestation larvaire par *T. circumcincta* et *H. contortus* (Roeber, Jex, Gasser 2013).

Cependant, cette « fuite » de pepsinogène est parfois remise en cause. Selon certains auteurs, la muqueuse abomasale de veaux infestés par *Osterga ostertagi* est aussi imperméable que celle de veaux sains. L'augmentation du pepsinogène pourrait être d'origine multifactorielle et faire intervenir des mécanismes de sécrétions paracrines et endocrines (Schillhorn Van Veen 1988).

Le dosage du pepsinogène comme outil diagnostique des strongyloses fait l'objet de beaucoup d'étude chez les bovins, mais est moins étudié chez les ovins. Lors d'infestations expérimentales d'agneaux par *H. contortus*, la concentration en pepsinogène plasmatique est 2,5 à 3 fois plus élevée 15 jours après l'infestation, en raison des migrations larvaires dans la muqueuse abomasale. Cette augmentation est transitoire : le pepsinogène retrouve sa valeur basale 25 à 30 jours après le début de l'infestation expérimentale, lorsque toutes les L4 ont atteint le stade adulte.

Ce dosage n'est pas spécifique des strongyloses car d'autres maladies (parasitaires ou non) peuvent provoquer une augmentation de la concentration en pepsinogène plasmatique. Au final, le dosage du pepsinogène plasmatique présente peu d'intérêt à l'heure actuelle car, dans le cadre du dépistage des strongyloses gastro-intestinales, il est seulement révélateur des parasitoses larvaires de la caillette des ovins, et est très peu réalisé en routine (Jacquiet, Canellas, et al. 2014).

### 3.2.5. Diagnostic post-mortem des strongyloses

Un diagnostic post-mortem des strongyloses gastro-intestinales est parfois effectué à l'occasion d'une autopsie. Il est réalisé lors d'enquêtes épidémiologiques, de mortalité inexplicée et dans le cadre de bilans parasitaires expérimentaux. Dans ce dernier cas de figure, le but est de déterminer les espèces et le nombre de SGI présents dans le tractus digestif de l'animal, afin d'évaluer l'efficacité d'un traitement anthelminthique par exemple.

Les différentes techniques utilisées impliquent toutes l'ouverture et le lavage des différentes portions du tube digestif, et parfois le traitement chimique des muqueuses pour révéler les stades larvaires en migration. Ensuite, un examen minutieux de ces portions permet la mise en évidence des parasites ou de lésions parasitaires caractéristiques.

- Les infestations par *H. contortus* et *T. circumcincta* entraînent fréquemment une inflammation et une congestion de la muqueuse abomasale. On observe également des zones hémorragiques associées à des ulcères qui correspondent aux points de fixation des vers adultes hématophages. Si l'autopsie est réalisée rapidement après la mort, les adultes *H. contortus* sont aisément visualisables à la surface de la caillette en raison de leur grande taille (3 cm) et de leur coloration rouge (figure 10). Les adultes *T. circumcincta* sont plus difficiles à voir, mais l'observation de nodules blanchâtres formés à la surface de muqueuse lors du développement des larves L4 permet d'établir le diagnostic (figure 11) (Kerboeuf, Hubert, Hoste 1997).

- Les lésions de l'intestin grêle ne sont généralement pas visualisées. Occasionnellement, il est possible d'observer des lésions non-spécifiques comme un épaissement de la paroi avec la parfois présence d'ulcères et de pétéchies. Les adultes du genre *Nematodirus* peuvent être visualisés mais seules les larves possèdent un pouvoir

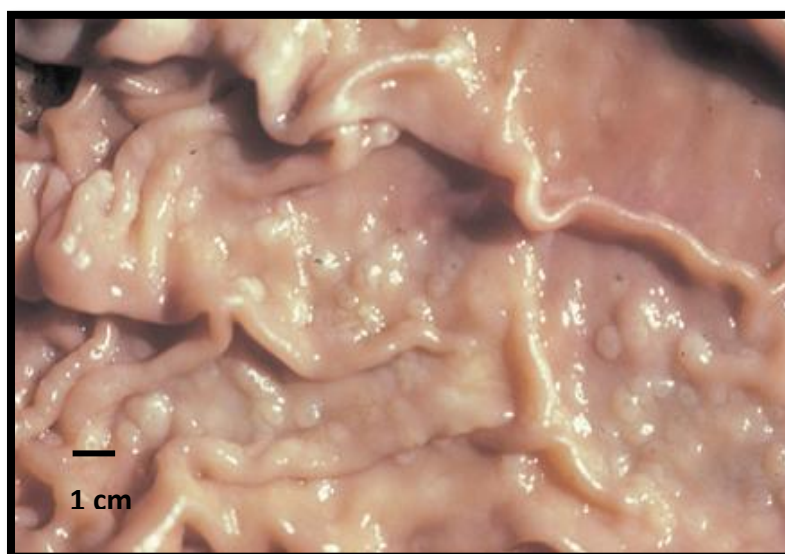
pathogène. Les lésions du gros intestin sont semblables, et quelques individus des espèces *Oesophagostomum venulosum* et *Chabertia ovina* peuvent directement être mis en évidence (Jacquiet, Canellas, et al. 2014).

Figure 11 : Adultes *H. contortus* à la surface de la muqueuse abomasale (crédit RM. KAPLAN).



Figure 12 : Lésions macroscopiques abomasales dues à une infestation par *T.circumcincta* (Crédit RM. KAPLAN)

La présence de nodules coalescents révèle le développement des larves L4.



Le comptage des vers totaux (Total Worm Count) représente un travail long et fastidieux, mais est un outil intéressant lors d'infestation expérimentale. Après ouverture, traitement et lavage des portions du tube digestif avec un volume déterminé, plusieurs aliquotes sont prélevées. Les échantillons sont observés à la loupe binoculaire puis au microscope et les vers adultes sont dénombrés et identifiés selon des critères de diagnose spécifique : taille, morphologie de l'extrémité antérieure et de la bourse caudale des mâles. La moyenne du nombre de vers comptés par espèce, rapportée sur le volume total du liquide de rinçage, permet d'effectuer une estimation de la charge parasitaire (Roeber, Jex, Gasser 2013).

Le TWC n'est pas réalisable en routine, et doit être pratiqué par un laboratoire spécialisé en helminthologie dans le cadre de bilans parasitaires.

#### **4. Les traitements pharmacologiques : utilisation des anthelminthiques de synthèse**

La maîtrise des infestations parasitaires est un enjeu majeur dans les élevages ovins du monde entier. Les strongyloses gastro-intestinales sont responsables de pertes de production sévères et leur importance économique est conséquente : en Australie, le coût annuel total engendré par ces maladies parasitaires chez les ovins et bovins a été estimé à 1 milliard de dollars (Roeber, Jex, Gasser 2013a).

Depuis le début des années 1960 et encore à l'heure actuelle, les principales méthodes de lutte contre les strongles gastro-intestinaux reposent sur l'utilisation de traitements chimiques anthelminthiques, dont l'administration peut être orale, topique (application Pour On) ou injectable. Ces traitements, apparus il y a environ 50 ans, ont largement contribué à la réduction de la prévalence des maladies parasitaires. En raison des bénéfices spectaculaires sur les productions, de leur sécurité d'emploi et de leur facilité d'administration, l'utilisation systématique et intensive des anthelminthiques s'est répandue. Un usage déraisonné est aujourd'hui à l'origine du phénomène de résistance aux anthelminthiques (cf. Partie 2) (Prichard 1994).

Il existe six familles d'anthelminthiques disponibles sur le marché mondial pour le contrôle des strongyloses ovines. Les résistances se généralisent pour les quatre familles

développées entre 1960 et 1980 (Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles, Imidazothiazoles, Salicylanilides, Lactones macrocycliques), et le développement actuel de nouvelles molécules anthelminthiques demeure difficile. Seules deux nouvelles familles ont été commercialisées au cours des vingt dernières années : les dérivés d'Aminocétonitrile et les Spiroindoles (Roerber, Jex, Gasser 2013a).

#### 4.1. Les familles d'anthelminthiques disponibles

##### 4.1.1. Benzimidazoles et pro-benzimidazoles

Les benzimidazoles et pro-benzimidazoles sont les plus anciennes familles d'anthelminthiques disponibles. La première molécule développée, le thiabendazole, a été commercialisée pour la première fois en 1961 (Köhler 2001).

Les molécules de cette famille sont dotées d'un large spectre : elles sont actives contre les strongles gastro-intestinaux (activité ovicide, larvicide et adulticide), les strongles respiratoires et les cestodes (*Moniezia spp*). Certaines molécules (Albendazole, Netobimin) sont également efficaces contre les trématodes (*Dicrocoelium lanceolatum* et *Fasciola hepatica*), tandis que le triclabendazole est exclusivement actif contre *F. hepatica* (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

La liaison de la molécule aux  $\beta$ -tubulines du parasite de manière spécifique inhibe leur polymérisation et donc la formation des microtubules cytoplasmiques. Il en résulte une désorganisation des cellules tégumentaires et intestinales, entraînant la mort du ver. Les microtubules permettent également la mise en place du fuseau mitotique lors de la division cellulaire : les cellules embryonnaires de l'œuf ne peuvent plus se diviser et meurent, illustrant l'activité ovicide de ces molécules (Köhler 2001).

Les benzimidazoles ne sont pas rémanents : l'effet est immédiat et la durée d'action est inférieure à 24h, l'animal peut donc se réinfester dès le lendemain du traitement. Leur administration s'effectue par voie orale et l'index thérapeutique est large, les surdosages sont rares. Seuls le nétohimin et l'albendazole sont embryo-toxiques, surtout lorsqu'ils sont utilisés à des posologies supérieures à 10 mg/kg de poids vif. Leur utilisation est donc interdite dans le 1<sup>er</sup> tiers de gestation (Jacquiet, Fidelle, et al. 2014).

Tableau 4 : Spectres d'action, posologies et restrictions d'usage des benzimidazoles utilisés en élevage ovin (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014).

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes, L4 + hypobiose, œufs)	Strongles pulmonaires	<i>Moniezia expansa</i>	<i>Fasciola hepatica</i> (adultes)	<i>Dicrocoelium lanceolatum</i> (adultes)	Restriction d'usage/femelles laitières
Fenbendazole	5 mg/kg VO					Délai d'attente lait : 8,5 jours
	10 mg/kg VO					
Oxfendazole	5 mg/kg VO					Délai d'attente lait : 8 jours
Mébéndazole (+ closantel en association)	15 mg/kg (+ 10 mg/kg) VO					Interdit 1 an avant le 1 <sup>er</sup> agnelage, en lactation et au tarissement
Albendazole	3,8 mg/kg VO (sauf hypobiose)					Interdit dans le 1 <sup>er</sup> tiers de gestation et en lactation
	7,5 mg/kg VO (sauf hypobiose)					
	15 mg/kg VO (sauf hypobiose)					
Netobimin	7,5 mg/kg VO					Délai d'attente lait : 5 jours Interdit dans le 1 <sup>er</sup> tiers de gestation
	20 mg/kg VO					



#### 4.1.2. Imidazothiazoles et Tétrahydropyrimidines

Le lévamisole (imidazothiazole) et le morantel (tétrahydropyrimidines) ont été découverts et commercialisés au milieu des années 1960 (Vlassoff, McKenna 1994). Aujourd'hui, seul le lévamisole est encore disponible en France. Son spectre d'action est nématocide : il est actif contre les stades adultes des strongles gastro-intestinaux et contre les strongles respiratoires, mais ne possède pas d'activité larvicide ni ovicide.

Les molécules de ces familles sont des agonistes cholinergiques agissant sur les synapses neuromusculaires des nématodes. Au niveau des cellules musculaires post-synaptiques, la fixation pérenne des molécules sur les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine des canaux sodiques provoque l'ouverture durable de ceux-ci (Köhler 2001). Le flux sodique entrant génère, par la suite, une dépolarisation permanente déclenchant la contraction généralisée des cellules musculaires. Ceci se traduit par une paralysie spastique du ver, entraînant son élimination dans les matières fécales (Wolstenholme et al. 2004).

Le lévamisole s'administre par voie injectable ou orale selon les formulations. Il est rapidement absorbé et excrété, il n'y a pas de rémanence. Parmi les anthelminthiques, il dispose de l'index thérapeutique le plus étroit, la dose thérapeutique étant proche de la dose toxique. Les intoxications génèrent une stimulation importante du système parasympathique de l'hôte : il est observé du ptyalisme, une bradycardie, des trémulations musculaires et dans les cas les plus graves, la mort peut survenir par paralysie des muscles respiratoires (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

**Tableau 5** : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage du lévamisole en élevage ovin (d'après Jacquiet, Fidelle, et al. 2014).

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes et L4)	Strongles pulmonaires (adultes)	<i>Moniezia expansa</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	Restriction d'usage/femelles laitières
Lévamisole	7,5 mg/kg IM, VO		/			Interdit 2 mois avant le 1 <sup>er</sup> agnelage, en lactation et au tarissement

#### 4.1.3. Salicylanilides

Le closantel et le nitroxinil sont des anthelminthiques de la famille des salicylanilides. Ces molécules possèdent un spectre d'action étroit : elles ne sont efficaces que contre les nématodes strictement hématophages (*H. contortus*), contre *F. hepatica* chez les ovins, et contre les larves L1 à L3 d'*Oestrus ovis* (diptère dont les larves parasitent les cavités nasales des ovins) dans le cas du closantel. En effet, le closantel et le nitroxinil se lient de manière spécifique et irréversible aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine. Si le sang est le lieu de stockage principal des salicylanilides, leur distribution aux tissus est très faible (Veillet 2001).

Les salicylanilides découplent la phosphorylation oxydative spécifique des parasites dans les mitochondries. Le closantel, en agissant comme un ionophore membranaire à  $H^+$ , perturbe le gradient de protons entre les compartiments mitochondriaux, soit le moteur de la production d'ATP. Le parasite est ainsi privé de sa source d'énergie, épuise ses réserves énergétiques puis est éliminé (Köhler 2001).

Le closantel s'administre par voie orale ou injectable selon les spécialités. Il est souvent retrouvé en association avec d'autres molécules (oxfendazole, mébendazole, ivermectine) de manière à élargir son spectre aux SGI non-hématophages et aux cestodes (Jacquet, Fidelle, et al. 2014). Le principal avantage de cette molécule est sa rémanence, d'environ cinq semaines vis-à-vis d'un strongle hématophage comme *H. contortus*, en raison du temps de demi-vie élevé de cette molécule dans le sang. L'index thérapeutique est également large, les intoxications surviennent lorsque la dose administrée est quatre fois supérieure à la dose recommandée (Veillet 2001).

**Tableau 6** : Spectres d'action, posologies et restrictions d'usage des salicylanilides utilisés en élevage ovin (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014).

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes et L4 + hypobiose)	Strongles pulmonaires (adultes et larves)	<i>Moniezia expansa</i>	<i>Oestrus ovis</i>	<i>Fasciola hepatica</i> (adultes et larves)	<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	Restriction d'usage/femelles laitières
Closantel	10 mg/kg SC, VO (hématophages)			10 mg/kg SC, VO			Interdit 1 an avant le 1 <sup>er</sup> agnelage, en lactation et au tarissement
Closantel (+ Oxfendazole en association)	10 mg/kg (+ 5 mg/kg) VO						
Closantel (+ Mébendazole en association)	10 mg/kg (+ 15 mg/kg) VO						
Closantel (+ Ivermectine en association)	5 mg/kg + (0,2 mg/kg) SC						
Nitroxinil	10 mg/kg SC, (hématophages)				10 mg/kg SC		

#### 4.1.4. Lactones macrocycliques

Les molécules appartenant à la famille des lactones macrocycliques ont été commercialisées pour la première fois en 1981 (Vlassoff, McKenna 1994). Cette famille regroupe les avermectines (ivermectine, doramectine, éprinomectine) et les milbémycines (moxidectine). Ces molécules sont qualifiées d'endectocides : elles sont très efficaces contre les nématodes des ovins (adulticides et larvicides dont les L4 en hypobiose) mais également contre certains arthropodes ectoparasites, en particulier les insectes et les acariens (voir

tableau 7). En revanche, elles n'ont aucune action sur les cestodes et les trématodes (Roos et al. 1993).

Ces molécules partagent le même mode d'action, bien que l'existence de plusieurs types d'interaction avec les récepteurs cibles soit suspectée selon la molécule utilisée. Les lactones macrocycliques se fixent aux récepteurs des canaux  $\text{Cl}^-$  sensibles au glutamate, spécifiques des synapses neuromusculaires des nématodes et arthropodes (Prichard 1994). Cette interaction induit une conformation ouverte en permanence des canaux  $\text{Cl}^-$  et donc l'entrée massive d'ions chlorure dans la cellule musculaire. Ce mouvement ionique est responsable d'une hyperpolarisation de la cellule qui est alors réfractaire à toute dépolarisation et contraction. Il est observée une paralysie flasque des parasites, ainsi que des dysfonctions de la pompe pharyngée des nématodes qui ne peuvent plus s'alimenter (Köhler 2001). Il semblerait que les lactones macrocycliques agissent de manière similaire sur les canaux  $\text{Cl}^-$  sensible au GABA, mais à plus forte concentration (Prichard et al. 2012).

Les lactones macrocycliques sont disponibles en formulations orales, injectables et Pour-on. Le spectre d'action des formulations orales concerne les nématodes et larves d'*Æstrus ovis*, tandis que celui des formulations injectables est étendu aux arthropodes. Les formulations Pour-On sont pour la plupart actives contre les nématodes et larves d'*Æstrus ovis*, mais certaines possèdent également une activité contre les arthropodes. Leurs propriétés lipophiles leur confèrent une rémanence de plusieurs semaines, avec une accumulation dans les tissus adipeux puis une lente distribution dans l'organisme (Abbott, Taylor, Stubbings 2012). Cette rémanence varie de 2 à 5 semaines selon la molécule et l'espèce parasitaire, mais peut atteindre 3 mois dans le cas de la formulation moxidectine longue action injectable (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

L'index thérapeutique des lactones macrocycliques est très large, la toxicité apparaît pour une dose administrée 5 fois supérieure à la dose recommandée. En effet, les mammifères ne possèdent pas de canaux  $\text{Cl}^-$  sensibles au glutamate, et leurs canaux  $\text{Cl}^-$  GABA-dépendants se situent dans le système nerveux central. Or celui-ci est protégé de l'action des molécules par la barrière hémato-méningée. Il est à noter que chez la plupart des chiens de races Colley et apparentées, une mutation du gène MDR-1 provoque la perméabilité de cette barrière aux lactones macrocycliques. Ce mécanisme est bien décrit en médecine vétérinaire des animaux de compagnie mais ne se retrouve pas chez l'espèce ovine (Prichard, Ménez, Lespine 2012).

L'un des problèmes actuels concernant la plupart des lactones macrocycliques est leur interdiction d'utilisation chez les femelles laitières en lactation et au tarissement. Depuis fin 2016, l'éprinomectine est la seule molécule autorisée pour laquelle le délai d'attente lait est nul.

**Tableau 7** : Spectres d'action, posologies et restrictions d'usage des lactones macrocycliques utilisées en élevage ovin (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014 et modifié selon l'évolution de la réglementation)

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes et L4 + hypobiose)	Strongles pulmonaires (adultes et larves)	<i>Oestrus ovis</i>	<i>Moniezia expansa</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	Restriction d'usage/femelles laitières				
Ivermectine	0,2 mg/kg VO						Interdit 28 jours avant le 1 <sup>er</sup> agnelage, en lactation et au tarissement				
	0,2 mg/kg SC (+ <i>Psoroptes ovis</i> , <i>Sarcoptes scabiei</i> , <i>Melophagus ovinus</i> )						Interdit 21 jours avant le 1 <sup>er</sup> agnelage, en lactation et au tarissement				
Doramectine	0,2 mg/kg IM (+ <i>Psoroptes ovis</i> )						interdit 70 jours avant le 1 <sup>er</sup> agnelage, en lactation et au tarissement				
Eprinomectine (AMM depuis 2016)	0,5 mg/kg PO						Délai d'attente lait : nul				
Moxidectine	0,2 mg/kg VO				Délai d'attente lait : 5 jours						
	Cydectine® 1% : 0,2 mg/kg SC (+ <i>Psoroptes ovis</i> )							interdit 2 mois avant l'agnelage, en lactation et au tarissement			
	Cydectine® LA 2% : 1 mg/kg SC base de l'oreille (+ <i>Psoroptes ovis</i> )										Interdit chez les femelles laitières à tout stade

#### 4.1.5. Dérivés d'aminocétonitrile (AADs)

Seul représentant de cette nouvelle famille d'anthelminthiques, le monépantel a été commercialisé pour la première fois en 2009 en Nouvelle-Zélande mais est indisponible en France à l'heure actuelle, après avoir été commercialisé quelques années seulement. Il a été développé suite à l'apparition de résistance aux lactones macrocycliques (Epe, Kaminsky 2013). Lors de son lancement, il a été démontré que le monépantel était actif contre les stades adultes et L4 des principaux SGI des ovins, ainsi que contre les souches multi-résistantes aux autres familles d'anthelminthiques (Kaminsky et al. 2008).

Le monépantel est un agoniste cholinergique des synapses neuromusculaires des nématodes. Son mode d'action est semblable à celui du lévamisole (cf. 4.1.2.), à la différence qu'il se lie à la sous-unité DEG-3 du récepteur nicotinique à l'acétylcholine, spécifique des nématodes. Ainsi, la toxicité du monépantel est quasi-nulle chez les mammifères, qui ne possèdent pas cette sous-unité. Il a été démontré que, suite à l'administration d'une dose égale à cinquante fois la dose thérapeutique, les seuls effets secondaires observés étaient un abattement et une anorexie pendant 24h (Hafsi, China, Ghalmi 2012).

Le monépantel ne semble pas être rémanent mais son utilisation demeure néanmoins intéressante en cas de multi-résistance, notamment aux lactones macrocycliques (George et al. 2012, Kaminsky et al. 2011). Il est interdit chez les brebis laitières à tous les stades de leur vie.

**Tableau 8** : Spectre d'action, posologie et restrictions d'usage du monépantel en élevage ovin (d'après Hafsi, China, Ghalmi 2012).

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes et L4 + hypobiose)	Strongles pulmonaires (adultes)	<i>Moniezia expansa</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	Restriction d'usage/femelles laitières
Monépantel	2,5 mg/kg VO	[Zone hachurée]				Interdit chez les brebis laitières en lactation à tout stade

#### 4.1.6. Spiroindoles

Le derquantel est un dérivé semi-synthétique du paraherquamide appartenant à la classe des spiroindoles. La seule formulation disponible est associée à l'abamectine, une molécule appartenant aux lactones macrocycliques (Little et al. 2010). Le derquantel a été introduit en Nouvelle-Zélande et au Royaume-Uni en 2010 mais n'est pas disponible en France. Son spectre d'action est mal connu mais semble concerner les adultes et L4 des principales espèces de strongles gastro-intestinaux (à l'exception des L4 de *Nematodirus spp*, *O. venulosum*, *C. ovis* et *Cooperia spp*). L'abamectine permet d'étendre le spectre aux L4 en hypobiose et aux strongles respiratoires (Epe, Kaminsky 2013).

Le derquantel est un antagoniste cholinergique. Sa liaison au récepteur nicotinique inhibe la fixation de l'acétylcholine et conduit à la paralysie flasque du nématode (Geurden et al. 2012). Tout comme le monépanel, le derquantel a été introduit afin de limiter la progression des résistances aux précédents anthelminthiques.

Le derquantel est toxique à partir de 3 fois la dose recommandée. Il est utilisable en lactation avec un temps d'attente lait de 35 jours.

**Tableau 9** : Spectre d'action, posologie et restrictions d'usage du derquantel (+ abamectine) en élevage ovin (d'après Jacquet, Fidelle, et al. 2014; Epe, Kaminsky 2013)

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes et L4 + hypobiose)	Strongles pulmonaires (adultes)	<i>Moniezia expansa</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	<i>Dicrocoelium lanceolatum</i>	Restriction d'usage/femelles laitières
Derquantel (+ Abamectine)	2 mg/kg (+ 0,2 mg/kg) VO		[Zone hachurée]			Temps d'attente : lait : 35 jours viande : 14 jours

## 4.2. La gestion traditionnelle du parasitisme en élevage

En élevage conventionnel, la gestion du parasitisme repose principalement sur l'utilisation répétée des anthelminthiques présentés précédemment. Dans la plupart des élevages, les brebis sont traitées au début de l'hiver, lors de la rentrée en bergerie. Les agneaux nés au début du printemps sont traités au milieu de l'été, soit lors du pic de contamination, et à la rentrée en bergerie. Il n'existe cependant pas de schéma type de traitement, la gestion du parasitisme est à adapter selon le contexte épidémiologique de chaque élevage.

Il est fréquent que tous les animaux du cheptel soient traités simultanément, y compris ceux ayant une forte résilience aux SGI ou excrétant peu d'œufs. De plus, en raison des restrictions d'usages de certains anthelminthiques et de la nécessité d'étendre parfois le spectre à d'autres parasites (*D. lanceolatum*), certains éleveurs utilisent exclusivement la même molécule à chaque traitement pendant plusieurs années consécutives. Ces pratiques courantes ont mené à une perte d'efficacité des anthelminthiques en raison de l'apparition de résistances (cf. partie 2.).

Des alternatives aux traitements chimiques ont été développées pour lutter contre les strongles gastro-intestinaux. Ces méthodes, basées sur la gestion des pâtures et l'amélioration de la résistance de l'hôte, ont pour but de réduire l'emploi des anthelminthiques afin de préserver leur efficacité en limitant la progression des résistances (Hoste, Guitard, Pons 2003).

## **5. Les méthodes alternatives aux traitements de synthèse**

### 5.1. La gestion des pâtures

Les stratégies basées sur la gestion des pâtures ont été proposées à la fin des années 1960, comme compléments ou alternatives à l'utilisation des anthelminthiques de synthèse. Le principe général de ces méthodes est de faire évoluer les ovins sur des pâtures aussi peu contaminées que possible. Il existe pour cela trois stratégies différentes, ayant pour objectif de réduire le risque parasitaire dans l'espace et le temps : réduire la densité larvaire des



pâtures, exploiter la mortalité naturelle des larves, et provoquer leur destruction (Torres-Acosta, Hoste 2008).

#### 5.1.1. Dilution du risque parasitaire par réduction de la densité larvaire

- *Gestion de la densité de population*

Plusieurs études ont montré que le niveau d'infestation parasitaire d'un cheptel est lié à la densité de population ovine sur les pâtures (Torres-Acosta, Hoste 2008). D'une part, plus il y a d'individus sur une parcelle, plus celle-ci est infestée par les œufs excrétés. D'autre part, lorsqu'un nombre élevé d'individus évolue sur une même pâture, l'épuisement progressif des ressources alimentaires conduit les animaux à se nourrir à proximité des zones de rejet, soit des matières fécales. Ces zones de rejet concentrant de nombreuses L3 infestantes, la contamination est ainsi accélérée. Il apparaît donc nécessaire de ne pas surcharger les pâtures, mais la superficie des terrains disponibles et l'organisation agronomique des élevages ne permet pas toujours la mise en place de ces mesures.

Il est également possible de « décaler » quotidiennement la parcelle pâturée : on autorise l'accès à une portion de pâture alors préservée, et le retour aux parcelles précédemment pâturées est interdit. Cette méthode empêche la consommation aux alentours des zones de rejets et est donc intéressant pour diminuer la probabilité de contamination. Cependant, de manière pratique, ce système nécessite une bonne gestion de la conduite d'élevage car il implique une charge de travail supplémentaire quotidienne aux exploitants (Gaillac 2013).

- *Pâturages mixtes*

Le pâturage mixte entre ovins (ou caprins) et bovins permet de réduire les infestations par les SGI au pâturage. Son utilisation repose sur la spécificité d'hôte relativement étroite des parasites des ruminants (cf. 2.1.1.) : les espèces de strongles digestifs et pulmonaires ainsi que les cestodes diffèrent en général entre les petits ruminants et les bovins. Ainsi, l'ingestion d'une larve infestante spécifique d'un parasite de mouton par

un bovin constitue un cul-de-sac épidémiologique, la larve ne peut finir son développement et est éliminée.

Le pâturage commun entre bovins et petits ruminants peut s'appliquer de deux manières différentes : soit les deux espèces pâturent en alternance sur les mêmes parcelles, soit ils occupent les mêmes surfaces de manière simultanée (Hoste, Guitard, Pons 2003). La première modalité possède l'avantage de superposer le nettoyage exercé par l'hôte résistant à la décontamination « naturelle » liée à la mise au repos de la parcelle. La deuxième modalité nécessite moins de parcelles. Il est alors conseillé de respecter un ratio de 1 bovin pour au maximum 4 à 5 ovins afin d'observer une diminution de la charge parasitaire des ovins.

Une étude de 1991 a montré que le pâturage alterné permettait de diminuer la charge parasitaire des ovins de l'ordre de 70%, tandis qu'il a été démontré que le pâturage simultané s'accompagnait d'une réduction de l'excrétion fécale de 30 à 60% (Hoste, Guitard, Pons 2003). Le pâturage commun est donc une alternative efficace aux traitements chimiques et reste relativement simple à mettre en œuvre pour les élevages possédant une activité mixte ovine/caprine et bovine, ce qui n'est pas toujours le cas.

- *Mélange d'animaux sensibles et résistants*

Après plusieurs saisons de pâturage, les bovins et dans une moindre mesure, les ovins, acquièrent une immunité partielle contre les strongles gastro-intestinaux. Les adultes sont donc moins sensibles aux infestations que les agneaux et primipares, et il a été montré que le mélange d'individus de plusieurs catégories d'âge était intéressant pour le contrôle des strongyloses (Van Wyk, 1990).

Cependant, le phénomène de « *periparturient rise* » réduit l'immunité des brebis en fin de gestation et en début de lactation. Ainsi, seules les brebis tarées et les béliers peuvent être considérés comme résistants au sein d'un troupeau. Ces catégories représentant au maximum 30% des individus dans un élevage, le mélange des animaux sensibles et résistants est une méthode rarement suffisante pour un contrôle efficace du parasitisme.

### 5.1.2. Utilisation de la mortalité naturelle des larves : la rotation des pâtures

Comme il a été vu précédemment, la survie des L3 est limitée dans l'environnement extérieur, et la durée de cette survie dépend essentiellement des conditions de température et d'hygrométrie du milieu. Ainsi, des méthodes de rotation des pâtures ont été développées, dans le but d'introduire les animaux sur des parcelles assainies naturellement après une période de repos (Torres-Acosta, Hoste 2008).

En milieu tropical, la plupart des larves de *H. contortus* atteint le stade L3 en une semaine, et leur survie n'excèdent pas six semaines. En raison de cette courte durée de survie, des résultats intéressants ont été obtenus par la méthode de rotation des pâtures. Une méthode envisageable consiste à délimiter dix parcelles, et à faire évoluer les animaux sur chaque parcelle pendant trois jours et demi. Cette durée inférieure à une semaine évite les réinfestations, et permet de déplacer les animaux les mêmes jours de la semaine. Le troupeau est de retour sur la première parcelle trente-et-un jours et demi après l'avoir quittée, ce qui représente un délai suffisant pour observer une diminution considérable du nombre de larves L3 sur la pâture (Waller 2006). Ainsi, dans les régions tropicales et subtropicales, il semblerait possible à l'heure actuelle de réduire considérablement l'utilisation des anthelminthiques de synthèse par l'application de cette méthode (Waller 1999).

La rotation des pâtures est nettement moins efficace en régions tempérées, en raison de la plus grande longévité des L3. Celles-ci peuvent survivre pendant trois à douze mois selon les conditions climatiques, et ainsi infester un hôte lors la saison suivante. Lors d'une mise au repos d'une pâture, un assainissement efficace est donc illusoire mais un changement de parcelle peut cependant être effectué juste avant le pic de contamination larvaire : on parle de stratégie évasive (Waller 2006). Une alternance chaque année avec des cultures sur parcelles fauchées permettra de maintenir les pâtures à un niveau d'infestation largement acceptable (Van Wyk, 1990), mais requiert une gestion agronomique complexe pour les éleveurs.

### 5.1.3. Destruction des stades libres de strongles gastro-intestinaux

- *Les champignons nématophages*

Le contrôle biologique des strongles gastro-intestinaux cible les stades libres sur les pâtures, avant l'apparition des L3. Parmi les moyens de lutte envisageables, l'utilisation de champignons ou mycètes nématophages apparaît prometteuse. Plusieurs espèces de champignons possèderaient la capacité de piéger puis de détruire les nématodes au sein des fèces, réduisant ainsi le niveau de contamination des pâtures (Larsen 1998).

*Duddingtonia flagrans* est l'espèce la plus étudiée. Ses chlamydospores survivent au passage dans le tube digestif de l'hôte, sporulent dans les fèces et forment un réseau tri-dimensionnel capable de piéger les stades libres des nématodes parasites. Elles sont administrées chaque jour par voie orale, sous forme de compléments alimentaires ou de blocs à lécher (Torres-Acosta, Hoste 2008). L'utilisation de *D. flagrans* ne représente pas de risque pour l'environnement, elle n'affecte pas le développement des autres espèces de champignons et des nématodes libres du sol. Cette espèce ne persiste pas plus de deux mois sur les pâtures (Saumell et al. 2016).

Bien que les tests effectués *in-vitro* soient prometteurs, l'efficacité sur le terrain peine à être démontrée et varie selon les études. Epe et al. n'ont pas mis en évidence de différence significative entre la NEC, le FEC, les cultures larvaires et l'hématocrite de deux lots de vingt agnelles, un lot témoin et un lot traité quotidiennement avec des spores de *D. flagrans* pendant trois mois (Epe et al. 2009). A l'inverse, une étude de 2016 décrit une efficacité réelle sur *H. contortus*, avec une réduction d'environ 50% de la population larvaire dans les fèces (Aguilar-Marcelino et al. 2016).

En raison de ces résultats contradictoires, les spores de *D. flagrans* ne sont pas encore commercialisées à grande échelle à l'heure actuelle. Leur utilisation combinée aux traitements chimiques semble néanmoins intéressante à l'avenir, dans le contexte de résistance aux anthelminthiques de synthèse.

- *Les spores de Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie gram + présente naturellement dans le sol. Elle est ubiquiste et fut isolée en 1901. Son principal intérêt en parasitologie réside dans son activité insecticide, et les premières formulations commerciales datent des années 1960. Des études récentes ont démontré que *B. thuringiensis* possédait également une activité nématocide, qui pourrait représenter une alternative aux traitements de synthèse dans la lutte contre les SGI (Wei et al. 2003).

Cette bactérie synthétise des « protéines-cristaux » ou delta-endotoxines lors de la germination des spores. Une fois ingérées, ces endotoxines sont activées par protéolyse, se lient à des récepteurs spécifiques de la membrane intestinale et génèrent des pores dans l'intestin, ce qui conduit à la mort de l'insecte ou du nématode. Il semblerait cependant exister d'autres modes d'action de ces toxines, puisque certaines études ont mis en évidence une toxicité envers les œufs et les L3 de nématodes, stades qui ne se nourrissent pas (Sinott et al. 2012, Kotze et al. 2005).

Plusieurs études ont démontré que, *in vitro*, *B. thuringiensis* inhibait significativement le développement et l'activité des stades libres (L1 et L2) de *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*. Ainsi, les stades libres peuvent être ciblés dans les fèces de ruminants par l'administration orale de spores de *B. thuringiensis*, de manière similaire à l'utilisation de spores de *D. flagrans*. De plus, Kotze et al. ont démontré que les SGI adultes étaient également sensibles aux endotoxines. Cependant, lors d'études *in vivo* (administration d'une suspension d'endotoxines de *B. thuringiensis* par voie orale), il a été observé l'inactivation des endotoxines bactériennes dans le tractus digestif des ruminants. Les conditions physico-chimiques du tube digestif, notamment l'acidité de la caillette, sont probablement à l'origine de la perte d'efficacité des toxines (Kotze et al. 2005). Ainsi, les recherches actuelles visent à développer des méthodes qui protégeraient la structure des endotoxines jusqu'à l'organe cible.

- *Les particules de cuivre*

Les particules d'oxyde de cuivre ont été commercialisées à l'origine afin de traiter les carences en cuivres en élevage. Par la suite, plusieurs études ont démontré l'intérêt de la complémentation en cuivre pour le traitement des infestations par les strongles abomasaux

(Torres-Acosta, Hoste 2008). Les particules d'oxyde de cuivre s'administrent sous forme de capsules qui se dissolvent dans le rumen, puis les particules atteignent la caillette et délivrent le cuivre sous forme ionisée pendant environ trois mois. Ce traitement est très efficace contre les infestations par *H. contortus*, mais les résultats sont moins convaincants concernant *T. circumcincta*. Il n'est en revanche pas rapporté d'efficacité des particules de cuivre envers les strongles intestinaux (Waller 1999).

Les particules d'oxyde de cuivre pourraient être exploitables dans les régions tropicales et sub-tropicales, où *H. contortus* est majoritaire. Cependant, des études complémentaires sont encore nécessaires afin de préciser la toxicité de ce traitement non conventionnel sur l'hôte et l'environnement.

## 5.2. Les méthodes basées sur l'amélioration de la résistance de l'hôte

### 5.2.1. Importance de l'alimentation dans le contexte parasitaire

Chez les ruminants, les carences nutritionnelles consécutives au parasitisme gastro-intestinal sont causées par trois mécanismes : une réduction de l'appétit (déficit d'apports), une malabsorption/malassimilation, et une réorientation du métabolisme pour maintenir l'homéostasie du sang et des tissus. Les conséquences de ces processus pathologiques sont des retards de croissance et une diminution des productions de laine et de lait.

Les déficits concernent fréquemment le métabolisme protéique et affectent moins la balance énergétique. Plusieurs études expérimentales ont montré que la supplémentation protéique améliorait la résilience des animaux infestés et limitait le phénomène de *periparturient rise* (Tabel 2011). Cette supplémentation peut consister en l'administration de blocs d'urée-mélasse riches en azote non protéique, qui s'avère être intéressante pour les animaux à risques (jeunes en croissance, brebis autour de la mise-bas) et bon marché. Cependant, les quantités à fournir pour couvrir les besoins des animaux parasités ne sont pas établies avec précision à l'heure actuelle (Torres-Acosta, Hoste 2008).

### 5.2.2. Amélioration de l'immunité grâce à la vaccination

Suite à la découverte de l'acquisition d'une immunité partielle contre les SGI après la première saison de pâturage, il a été envisagé l'élaboration de vaccins contre les strongyloses gastro-intestinales. A l'heure actuelle, un seul vaccin efficace est commercialisé en Océanie pour lutter contre les SGI. Ce vaccin, BarberVax ND, cible exclusivement l'espèce *H. contortus*. Il s'agit d'un vaccin à « antigènes cachés », car composé de protéines de la membrane des cellules épithéliales de l'intestin de ce nématode. Lorsqu'un ovin est vacciné avec BarberVax ND, il élabore de grandes quantités d'anticorps spécifiques de ces protéines. Puis, lors d'infestations naturelles par des vers de l'espèce *H. contortus*, ces derniers ingèrent des anticorps dirigés contre leurs propres constituants internes. Ceci a pour conséquence une mortalité accrue et surtout une importante réduction de la fécondité des vers femelles.

### 5.2.3. Sélection génétique d'ovins naturellement résistants

La sélection de lignées d'ovins génétiquement résistants a initialement fait l'objet de programmes de recherche en Australie et en Nouvelle-Zélande. En effet, la production ovine de ces pays est essentiellement basée sur des races très productives mais sensibles au parasitisme, et la résistance aux anthelminthiques constitue un problème majeur. Aujourd'hui, de tels programmes sont également développés en Europe, notamment en France.

La résistance d'un individu est son aptitude à s'opposer à l'infestation parasitaire. Elle est principalement évaluée par le FEC, qui est bien corrélé à la charge parasitaire chez les jeunes. Ce caractère semble héritable et constitue l'un des principaux critères de sélection (Waller 1999). La sélection d'ovins résistants a un double objectif : réduire la charge parasitaire des individus et réduire le niveau de contamination des pâtures.

Des programmes de sélection privilégiant la résilience de l'hôte peuvent également être envisagés, mais les critères de sélection pertinents (GMQ, production laitière) sont plus complexes à objectiver que le FEC. Ainsi, ces programmes suscitent moins d'intérêt que ceux mis en place pour la sélection de la résistance (Torres-Acosta, Hoste 2008).

#### 5.2.4. Utilisation d'anthelminthiques naturels : les tannins

Certains végétaux utilisés dans l'alimentation en élevage sont considérés comme bio-actifs : ils contiennent des métabolites secondaires, les tannins, dont certains possèdent des propriétés anthelminthiques et augmentent la résilience de l'hôte. Ces végétaux sont définis comme « nutraceutiques » car les effets bénéfiques de leur consommation sont supérieurs à leurs apports nutritionnels directs (Torres-Acosta, Hoste 2008).

Les tannins sont des polyphénols variés qui possèdent une haute affinité pour les protéines et les polysaccharides. On distingue deux types de tannins, selon leurs structures :

- Les tannins hydrolysables : ce sont des esters d'acide gallique ou ellagique facilement hydrolysables. Leur dégradation en acide gallique puis l'absorption de cet acide dans le tube digestif des ruminants est responsable d'effets néfastes sur l'organisme.

- Les tannins condensés : ce sont des polyphénols de haut poids moléculaire. Ils forment des complexes solubles ou insolubles avec différentes macromolécules, en particulier les protéines, et sont très peu absorbés par la muqueuse digestive.

Les tannins condensés sont majoritairement présents dans les fourrages de légumineuses (fabacées), tels que le sainfoin, la luzerne, le lotier ou le trèfle. Selon des études *in-vivo*, la consommation de ces fourrages serait associée à une réduction du FEC, de la charge parasitaire et de la fécondité des vers (Hoste et al. 2006).

Deux hypothèses principales sont établies afin d'expliquer les effets bénéfiques de l'ingestion de tannins condensés chez les ovins parasités :

- D'une part, la liaison des tannins aux protéines protégerait celles-ci d'une dégradation dans le rumen, et entrainerait donc une absorption accrue des protéines d'intérêt dans l'intestin grêle. La réponse immunitaire au parasitisme et la résilience de l'hôte seraient améliorés, mais aucune étude n'a permis de confirmer cette hypothèse.

- D'autre part, les tannins condensés exercent une activité anthelminthique directe. Des études *in-vitro* ont montré que les tannins possédaient également une affinité pour les protéines constitutives de la cuticule et du tube digestif des nématodes, et altèreraient leurs propriétés physico-chimiques. Ils pourraient de plus inhiber ou retarder le dégainement des L3 (Hoste et al. 2006).



Beaucoup de questions restent en suspens concernant le mode d'action des tannins et les composés biochimiques actifs. Les études actuelles visent à préciser les conditions optimales d'utilisation des tannins, en particulier leur efficacité en fonction du stade de la plante et des saisons. Il est tout de même probable que les tannins occupent à l'avenir une place prépondérante dans la lutte intégrée contre les strongyloses gastro-intestinales, en tant qu'alternative ou compléments aux anthelminthiques de synthèse (Waller 2006).

**PARTIE 2 : LA RESISTANCE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX  
AUX ANTHELMINTHIQUES DE SYNTHESE**



## **1. Principes de la résistance aux anthelminthiques**

### 1.1. Introduction et définition de la résistance aux anthelminthiques

Le développement et la distribution mondiale des anthelminthiques de synthèse, associés aux méthodes de gestion des pâtures précédemment évoquées, ont permis durant de nombreuses années un contrôle très efficace des pathologies ovines associées aux strongles gastro-intestinaux. Cependant, une conséquence inévitable de l'utilisation massive de ces molécules est la sélection, au sein des populations d'helminthes, d'individus résistants aux anthelminthiques (Taylor 2013).

Au cours des trois dernières décennies, il a été rapporté l'existence de populations résistantes aux anthelminthiques dans la plupart des pays où l'élevage ovin représente une part non-négligeable de l'économie agricole. Ces résistances concernent toutes les familles d'anthelminthiques et préoccupent aujourd'hui les élevages du monde entier. Dans certains pays comme l'Australie et la Nouvelle-Zélande, la prévalence et la sévérité des résistances sont telles qu'elles menacent la rentabilité de la filière dans son ensemble (Wolstenholme et al. 2004).

- **Définition de la résistance :**

*La résistance est la capacité héritable d'un parasite à survivre à une dose d'anthelminthique normalement efficace (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).*

En pratique, on considère un parasite comme résistant s'il n'est pas éliminé par l'utilisation d'un anthelminthique à la dose recommandée par le fabricant, et si cette aptitude à la survie est transmise à sa descendance. Il est cependant possible que certains individus résistants soient détruits par l'exposition à des doses supérieures.

## 1.2. Mécanismes d'apparition et de transmission de résistance

### 1.2.1. Rappel des bases génétiques utilisées en parasitologie

Les nématodes d'intérêt en parasitologie ovine sont des espèces diploïdes, c'est-à-dire qui possèdent  $n$ -paires de chromosomes. Au sein d'une paire, les chromosomes portent le même gène pour une position définie, le *locus*. Cependant, il existe plusieurs versions de chaque gène, appelées *allèles*. Ainsi, chaque individu diploïde possède 2 allèles pour un gène donné. Si les allèles sont identiques, l'individu est dit *homozygote* pour cet allèle, tandis que si les allèles sont différents, l'individu est *hétérozygote*. Un allèle peut être :

- *Dominant* : cet allèle permet à lui seul l'expression du caractère codé par le gène, l'allèle porté par l'autre chromosome reste silencieux. L'allèle dominant s'exprime chez les individus hétérozygotes et homozygotes pour cet allèle.

- *Récessif* : cet allèle s'exprime lorsque l'allèle porté par l'autre chromosome est identique, donc seulement chez les individus homozygotes.

### 1.2.2. Acquisition de résistance par un ou plusieurs individus

Il est admis que parmi des populations de SGI non-exposées à des anthelminthiques, des allèles conférant une résistance aux traitements chimiques préexistent. Ces allèles résultent de mutations aléatoires et spontanées de la séquence d'ADN de certains gènes qui sont transmis à la descendance. En dehors de toute pression de sélection (l'utilisation d'anthelminthiques de synthèse dans le cas présent), ces allèles ne procurent pas d'avantage sélectif (survie et reproduction) par rapport à l'allèle initial, et peuvent même être délétères. Leur fréquence demeure donc faible à très faible parmi la population (figure 13, point **A**).

La plupart des allèles de résistance aux anthelminthiques sont récessifs. Ainsi, un individu est résistant lorsqu'il est homozygote pour un de ces allèles. L'homozygotie est permise par l'acquisition de deux allèles identiques suite à la reproduction sexuée (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

### 1.2.3. Transmission de la résistance au sein d'une population

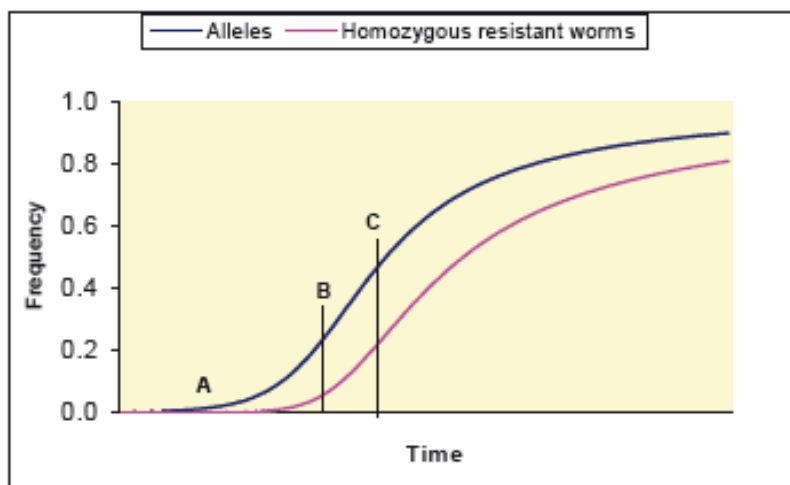
Lorsque la population de SGI est exposée pour la première fois à une molécule anthelminthique, la majorité des individus sensibles est éliminée, mais les homozygotes portant les allèles de résistance survivent et sont donc « sélectionnés ». Ils se reproduisent alors à une fréquence plus élevée que les homozygotes sensibles, ce qui propage l'allèle de résistance au sein de la population (Jacquiet, Fidelle, et al. 2014).

A chaque traitement identique successif, la fréquence de l'allèle de résistance dans la population augmente, jusqu'à ce que la résistance devienne apparente (figure 13) :

- La résistance est détectée par les tests de laboratoire lorsque moins de 95% des individus sont éliminés par le traitement (point B). A ce stade, au moins 25% des parasites sont déjà porteurs d'allèles de résistance (Paraud et al. 2014).

- La perte d'efficacité de l'anthelminthique devient cliniquement visible lorsque 20% des individus sont homozygotes résistants (point C).

Figure 13 : Fréquence des allèles de résistance et apparition de résistances dans un cheptel (d'après Taylor, 2013).



On considère que les allèles de résistance préexistent dans toutes les populations de SGI non-exposées. Ainsi, la sélection d'individus résistants est inévitable dès lors que l'on introduit des anthelminthiques de synthèse. La perte d'efficacité des anthelminthiques n'est

cependant pas une fatalité : il est primordial de détecter au plus tôt l'apparition de résistance par des tests de laboratoire, afin de mettre en œuvre des moyens pour empêcher ou ralentir la propagation des allèles de résistance au sein de la population (Taylor 2013).

### 1.3. Mécanismes de résistance aux anthelminthiques de synthèse

#### 1.3.1. Mécanismes non-spécifiques

Les mécanismes de résistance non-spécifiques développés par les SGI visent à empêcher en amont l'accès des molécules à leurs sites d'action. Les mutations peuvent ainsi entraîner :

- un changement dans le métabolisme des nématodes : les gènes codant pour certaines P-glycoprotéines (P-gp), qui agissent comme pompes d'efflux des antiparasitaires au niveau des cellules tégumentales et intestinales, sont surexprimés. Les molécules anthelminthiques peuvent également être inactivées suite à une détoxification par le cytochrome P450.

- des modifications de la distribution des molécules aux sites d'actions : des modifications structurales des neurones sensoriels entraînent une réduction de l'exposition de ces neurones aux anthelminthiques, notamment à l'ivermectine (Jacquiet, Fidelle, et al. 2014).

#### 1.3.2. Mécanismes spécifiques

Les mécanismes spécifiques mis en place par les nématodes font intervenir des mutations sur les cibles des anthelminthiques, de manière à ce que les interactions ne soient plus efficaces. De manière générale, un individu résistant à une molécule sera résistant à toutes les molécules de la famille d'anthelminthiques concernée. Ceci est à nuancer dans le cas des lactones macrocycliques, car les individus résistants à l'ivermectine ne sont pas initialement résistants à la moxidectine.

- *Mécanismes de résistance aux benzimidazoles et aux pro-benzimidazoles*

La résistance spécifique aux benzimidazoles et pro-benzimidazoles s'expliquerait par une perte d'affinité de ces molécules pour leur site d'action, la  $\beta$ -tubuline des microtubules, en raison d'une altération de la structure primaire de cette protéine. Une modification de l'isotype 1 de la  $\beta$ -tubuline surviendrait suite à la mutation ponctuelle du gène codant au niveau du codon 200. La mutation provoque la substitution de la phénylalanine par la tyrosine en position 200 de la séquence d'acides aminés de cet isotype (Köhler 2001).

Cette mutation récessive semble requise pour conférer une résistance aux benzimidazoles chez *H. contortus*, mais une mutation de même nature survenant en position 167 amplifierait le phénomène de résistance. Il semblerait que chez *T. circumcincta*, cette dernière mutation soit responsable à elle seule de résistance chez des individus homozygotes et hétérozygotes. L'allèle impliqué chez *T. circumcincta* pourrait donc être à caractère dominant (Wolstenholme et al. 2004)

Les deux mêmes polymorphismes concernent également l'isotype 2 de la  $\beta$ -tubuline et interviendraient dans le phénomène de résistance, mais l'importance de cet isotype est moins connue.

- *Mécanismes de résistance au lévamisole*

Les mécanismes moléculaires de la résistance au lévamisole sont mal connus. Ils pourraient impliquer l'absence de sous-unité sensible au lévamisole, qui forme chez les individus sauvages un des deux types de récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, au niveau de la synapse neuromusculaire des nématodes (Köhler 2001).

Il semblerait qu'un unique allèle lié au sexe soit à l'origine de la résistance au lévamisole de *T. colubriformis*, mais plusieurs gènes seraient impliqués chez *H. contortus* (Wolstenholme et al. 2004).

- *Mécanismes de résistance aux lactones macrocycliques*

Les mécanismes spécifiques de résistance aux lactones macrocycliques sont méconnus, mais sembleraient polygéniques : plusieurs gènes seraient impliqués. Chez des individus rendus résistants en laboratoire, la liaison de l'ivermectine sur son site d'action ne semble pas altérée, malgré la mise en évidence de modifications des récepteurs au glutamate des canaux chlorures. Ceci suggère que d'autres mutations sont nécessaires pour



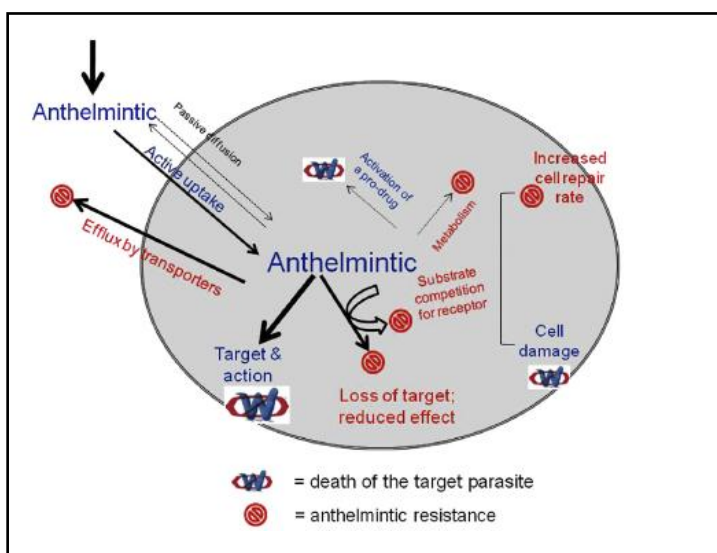
empêcher la liaison de la molécule sur son site d'action. Pour le moment, aucune des mutations potentiellement impliquées dans la résistance spécifique n'a pu être identifiée sur des prélèvements de terrain (Luo et al. 2017).

Actuellement, le phénomène de résistance aux lactones macrocycliques est en grande partie expliqué par des mécanismes non-spécifiques, comme l'action des pompes d'efflux P-gp. Un polymorphisme concernant les gènes codant les P-gp a été mis en évidence chez des individus naturellement résistants aux LM. De plus, une surexpression de ces gènes a été observée *in-vivo* et *in-vitro* chez des individus exposés au LM, tandis que l'ajout d'inhibiteurs des P-gp a entraîné une réversion de la résistance. Il est cependant difficile de croire que ce seul mécanisme soit à l'origine des résistances observées en élevage ovin (Kotze, Prichard 2016).

- *Mécanismes de résistance aux dérivés d'acétylcholine*

Les premières résistances au monépanel en élevage ont été observées en 2014 (Mederos, Ramos, Banchemo 2014), mais les mécanismes impliqués n'ont pas encore été décrits dans ces populations sauvages. En revanche, lors du développement de cette nouvelle molécule, des mutants d' *H.contortus* ont volontairement été sélectionnés en laboratoire afin d'anticiper l'apparition de résistance. Ces individus présentaient une mutation du gène *Hco-mptl-1* codant pour une sous-unité du récepteur à l'acétylcholine. Cependant, le caractère artificiel de cette sélection en laboratoire ne permet pas d'affirmer que cette mutation soit responsable des résistances apparues en élevage (Kotze, Prichard 2016).

Figure 14 : Diversité des mécanismes de résistance aux anthelminthiques (d'après Kotze, Prichard 2016).



## **2. La résistance aux anthelminthiques dans les cheptels ovins**

### 2.1. Conséquences de l'utilisation non-maitrisée des anthelminthiques

L'apparition d'allèles de résistance résulte de mutations aléatoires, indépendantes de l'utilisation des anthelminthiques. Si ces allèles persistent initialement à très basse fréquence, il est aujourd'hui admis que les pratiques d'élevage génèrent une pression de sélection responsable de la dissémination de ces allèles. L'utilisation non-maitrisée des traitements chimiques est donc liée à l'apparition d'un grand nombre d'individus chez lesquels on observe un phénotype résistant aux anthelminthiques. Dans certains pays (Australie, Nouvelle-Zélande, Afrique du Sud, Royaume-Uni), des cas de multi-résistances, c'est-à-dire des populations résistantes simultanément à plusieurs familles d'anthelminthiques, sont avérés (Cabaret 2012).

L'apparition puis la propagation de la résistance dans un élevage peuvent avoir trois types de conséquences (Jacquiet, Fidelle, et al. 2014) :

- La réduction de l'arsenal thérapeutique face aux strongyloses gastro-intestinales. Les traitements inefficaces appliqués constituent un manque à gagner pour l'éleveur.
- La diminution des performances zootechniques et la moindre valorisation des animaux, qui entraînent une perte économique directe. Le bien-être animal est également affecté.
- A terme, un niveau de résistance compromettant la survie de l'élevage : certaines exploitations en Afrique du Sud ont cessé leur activité car la maîtrise des infestations par *H. contortus* n'était plus possible (Cabaret 2012). Le Royaume-Uni est confronté au même problème depuis peu.

### 2.2. Les facteurs favorisant la transmission de la résistance

Il existe des facteurs accélérant la dissémination des allèles de résistance. Certains relèvent strictement des pratiques d'élevage, et doivent être identifiés avant d'envisager de mener une lutte efficace contre les strongles gastro-intestinaux. D'autres sont inhérents à la génétique et à la biologie des SGI, ils sont difficilement maitrisables mais doivent être considérés pour adapter le schéma thérapeutique.

### 2.2.1. Facteurs liés à la génétique et à la biologie des strongles gastro-intestinaux

- *Facteurs génétiques*

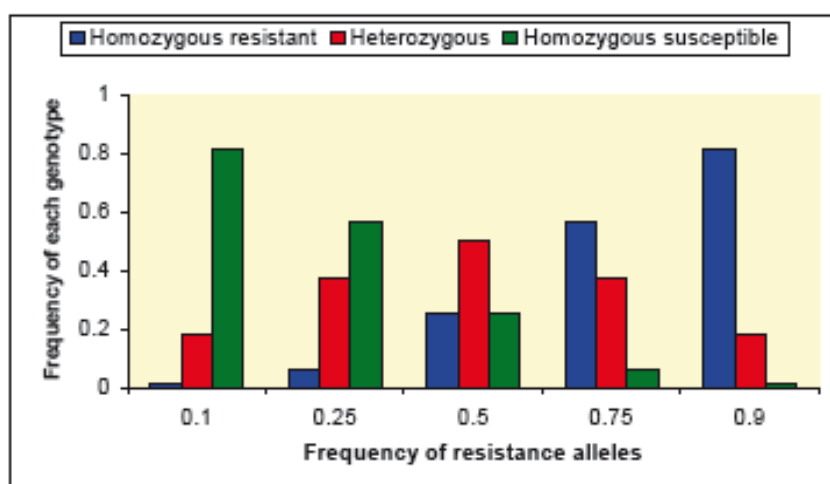
- **Polygénie** : le phénotype « résistant » peut être codé par un seul gène, ou être polygénique. Si un mécanisme de résistance est polygénique, la probabilité de rassembler chez un même individu tous les allèles impliqués dans la résistance est faible, donc la transmission d'une forte résistance sera plus lente dans les populations (Cabaret 2012).

- **Dominance** : les allèles de résistance aux BZ sont récessifs pour la plupart des espèces, donc seuls les individus homozygotes sont résistants (Cabaret 2012). En revanche, certains allèles de résistance aux LM pourraient être dominants, ce qui implique que le phénotype résistant est également présent chez les individus hétérozygotes. Dans ce cas, la résistance apparaît pour une fréquence plus faible de l'allèle de résistance dans la population, donc plus précocement (cf figure 15) (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

- **Fréquence des mutations** : la diversité génétique des SGI et le grand nombre d'individus au sein des populations majorent le risque d'apparition spontanée d'allèles de résistance.

- **Dérive génétique** : si un allèle de résistance confère un avantage sélectif supplémentaire, sa transmission sera favorisée en dehors de toute pression de sélection imputable aux anthelminthiques (Wolstenholme et al. 2004).

Figure 15 : Génotypes selon la fréquence des allèles de résistance dans la population (d'après (Abbott, Taylor, Stubbings 2012))



Pour une fréquence donnée de l'allèle de résistance dans la population, le phénotype résistant est plus fréquent si l'allèle de résistance est dominant (les génotypes hétérozygotes et homozygotes mutés présentent le phénotype résistant) que s'il est récessif (seuls les génotypes homozygotes mutés présentent le phénotype résistant).

- *Facteurs biologiques*

- **Nature du cycle biologique** : le cycle direct des SGI implique que l'avantage sélectif conféré par les allèles de résistance n'est pas dissipé suite au passage par un hôte intermédiaire.

- **Fécondité** : les espèces à haute fécondité génèrent à chaque génération de nombreux individus porteurs d'allèles de résistance.

- **Pathogénicité** : plus l'espèce est pathogène, plus elle sera soumise à la pression de sélection des traitements anthelminthiques répétés.

- **Climat** : les climats chauds et humides favorisent les cycles courts et l'absence d'hypobiose, donc sont propices à la dissémination rapide des allèles de résistance (Wolstenholme et al. 2004).

Les trois derniers facteurs présentés s'appliquent particulièrement à *H. contortus*, ce qui explique en partie l'apparition extrêmement rapide de résistance chez cette espèce (Kotze, Prichard 2016).

## 2.2.2. Facteurs liés à la conduite d'élevage

- *Fréquence d'utilisation d'un anthelminthique*

Comme il a été décrit précédemment, plus la fréquence d'utilisation d'une molécule est élevée, plus la pression de sélection est forte et plus les résistances se développeront rapidement. Après un traitement, entre l'ingestion d'une L3 sensible et le début de sa reproduction (soit la période pré-patente, d'environ trois semaines), tous les œufs excrétés proviennent d'individus ayant résisté au traitement. Or certains schémas thérapeutiques dits « suppressifs » consistent à traiter les animaux toutes les trois semaines, dans le but d'empêcher la reproduction des parasites et ainsi assainir les pâtures. Cette méthode

remplace donc progressivement tous les individus sensibles par des individus résistants, et assure la contamination des parcelles avec des L3 exclusivement résistantes (Torres-Acosta, Hoste 2008).

- *Sous-dosage*

Le sous-dosage des traitements pourrait être impliqué dans la progression des résistances, mais ce facteur semble remis en cause chez les ovins par certains auteurs.

En effet, si l'on considère un mécanisme de résistance monogénique impliquant un allèle récessif, Abbott et *al.* rapportent qu'une dose normale d'anthelminthique élimine les homozygotes sensibles et les hétérozygotes, supprimant par la même occasion la plupart des allèles de résistance de la population (voir figure 15). Cependant, un sous-dosage pourrait permettre la survie des hétérozygotes, le nombre d'allèles de résistance ne serait pas affecté et leur transmission serait donc favorisée. Ainsi, selon cette hypothèse, les sous-dosages pourraient faire se comporter les allèles récessifs comme des allèles dominants et expliqueraient la transmission des résistances aux BZ (Abbott, Taylor, Stubbings 2012). Cette théorie n'est pas partagée par Cabaret (Cabaret 2012) pour qui, parmi une population possédant un allèle de résistance récessif, seuls les homozygotes pour cet allèle sont résistants, même à faible dose. D'après cet auteur, le rôle du sous-dosage serait donc inexistant dans la dissémination de la résistance aux benzimidazoles.

En revanche, les mécanismes polygéniques de résistance pourraient être favorisés par le sous-dosage. En effet, un individu possédant seulement une partie des allèles de résistance serait doté d'une résistance partielle, et pourrait ainsi survivre à des faibles dose puis transmettre ses allèles (Cabaret 2012).

- *Rémanence des molécules*

L'utilisation de formulations longue-action, telles que la moxidectine injectable et les dispositifs intra-ruminaux de benzimidazoles, favorisent la sélection d'allèles de résistance dans les populations de SGI en maintenant une pression de sélection pendant plusieurs semaines (Jacquiet 2015).

- *Introduction d'individus résistants dans l'élevage*

Les animaux provenant d'autres élevages sont nécessairement accompagnés par le cortège de strongles qu'ils hébergent. Certains sont porteurs d'allèles de résistance qui seront transmis aux strongles autochtones du cheptel si des mesures de quarantaines ne sont pas appliquées (voir 3.3.4.) (Torres-Acosta, Hoste 2008).

- *Traitements systématiques et non-sélectifs*

Le traitement systématique de l'ensemble des animaux du cheptel avant la mise à l'herbe sur une parcelle saine est un facteur de risque clairement identifié. Lorsque tous les parasites sont soumis à la pression de sélection, peu de vers sensibles survivent et la population sera par la suite majoritairement constituée d'individus résistants. Il est fondamental de ne pas soumettre une partie de la population parasitaire à la pression de sélection, afin de conserver un pool d'allèles sensibles qui dilueront les homozygotes résistants : on parle de notion de refuge (Cabaret 2012, voir Partie 2, 3.1.1).

- *Traitements par inadvertance*

L'utilisation de traitements à large spectre affectant les SGI lorsque la cible est une autre espèce parasitaire (*D. lanceolatum*, *F. hepatica*, *O. ovis*) est une cause fréquente de développement de résistance (Torres-Acosta, Hoste 2008).

## 2.3. Etat des lieux des résistances à l'heure actuelle

### 2.3.1. Dans le monde

A l'heure actuelle, la lutte contre les résistances en élevage ovin est une préoccupation majeure, car des cas de résistances ont été rapportés dans toutes les régions du monde. Suite à la commercialisation d'une nouvelle molécule, les premiers cas de résistance ont, pour la plupart, été rapportés dans les dix ans qui suivirent le lancement. La majorité des premiers cas de résistance a été documentée chez *H. contortus*, mais les autres espèces pathogènes, en particulier *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, ont également

développé des mécanismes de résistance à la plupart des familles d'anthelminthiques (Kotze, Prichard 2016).

Depuis la fin des années 1990, des cas de multi-résistances sont fréquemment rapportés. Les premiers ont été décrits dans les pays de l'hémisphère sud (Australie, Nouvelle-Zélande, Afrique du sud, Amérique du sud), mais des multi-résistances ont également émergées au Royaume-Uni dans les années 2000.

Tableau 10 : Historique de l'apparition de résistance en élevage ovin dans le monde (d'après Kotze, Prichard 2016)

Famille d'anthelminthique	Molécule	Commercialisation	Premiers cas de résistance	Pays
<b><i>Benzimidazoles</i></b>	Thiabendazole	1961	1964	Etats-Unis
	Fenbendazole	1971	1975	Afrique du Sud
	Albendazole	1979	1979	Australie
	Oxfendazole	1975	1979	Australie
	Mebendazole	1971	1975	Afrique du Sud
<b><i>Salicylanilides</i></b>	Closantel	1977-1981	1982	Afrique du Sud
<b><i>Imidothiazoles</i></b>	Lévamisole	1965	1981	Australie
<b><i>Lactones macrocycliques</i></b>	Ivermectine	1981	1987	Afrique du Sud
	Abamectine	1985	2001	Australie
	Moxidectine	1992	2001	Nouvelle-Zélande
	Doramectine	1993	2001	Etats-Unis
	Eprinomectine	1996	2009	Suisse
<b><i>Dérivés d'acétonitrile</i></b>	Monepantel	2009-2010	2014	Uruguay

- *Hémisphère sud*

En Nouvelle-Zélande, une étude à grande échelle effectuée sur 112 élevages rapporte une prévalence globale des résistances de 64%. Il a été observé une résistance aux BZ dans 41% des élevages, et des résistances à l'ivermectine et au lévamisole dans 36% et 24% des

élevages, respectivement. De plus, 10% présentaient des résistances à l'ivermectine et au lévamisole et 8% présentaient des résistances aux trois familles testées. L'étude ne permet cependant pas de savoir si ces résistances sont acquises par trois populations distinctes ou par une seule présentant une multi-résistance aux trois familles d'anthelminthiques (Waghorn et al. 2006).

La situation est dramatique en Australie. Une étude entre 1991 et 1992 rapporte des résistances aux BZ dans 85% des élevages, et des résistances croisées BZ-lévamisole dans 34% (Overend et al. 1994). Depuis, les multi-résistances incluant les lactones macrocycliques se sont généralisées et les premières résistances aux plus récentes molécules, le monépanтел et le derquantel, ont été rapportées (Sales, Love 2016). Devant l'absence d'efficacité des anthelminthiques dans certaines régions, les éleveurs sont parfois contraints d'arrêter l'activité ovine durant plusieurs années pour espérer un assainissement naturel des pâtures.

- *Europe*

Les résistances aux BZ et au lévamisole sont fréquentes dans la plupart des pays européens (Rose et al. 2015). Une étude menée sur trente élevages en France, en Italie et en Grèce a permis de mettre en évidence de nombreux foyers de résistance aux BZ. En revanche, un seul cas de résistance aux LM a été découvert, dans un élevage grec présentant des multi-résistances (Geurden et al. 2014).

La situation est bien plus préoccupante en Ecosse, en Irlande et en Angleterre où plus de 80% des élevages hébergent des populations résistantes aux BZ. Des résistances aux LM sont présentes dans 24% des élevages irlandais (Keane et al. 2014), et des cas de triple-résistance aux principales familles anthelminthiques sont de plus en plus rapportés. L'espèce la plus fréquemment impliquée dans les cas de multi-résistance est *T. circumcincta* (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

### 2.3.2. En France

Les enquêtes à grande échelle sur les résistances aux anthelminthiques sont assez rares en France, mais les dernières effectuées montrent un niveau élevé de résistance aux benzimidazoles (voir Tableau 11). L'enquête de Chartier rapporte une prévalence des



résistances aux BZ de 83% dans le département des Deux-Sèvres (Chartier et al. 1998). Deux études s'intéressant aux élevages ovins laitiers d'Aveyron et des Pyrénées-Atlantiques n'ont pas mis en évidence de résistance aux lactones macrocycliques, mais des niveaux élevés de résistances aux BZ (fenbendazole et néobimin). La prévalence de 100% reste cependant à nuancer, les études ayant été réalisées dans des élevages où la suspicion de résistance était élevée (Geurden et al. 2014).

Un premier cas de résistance aux lactones macrocycliques a été découvert en France en 2014 (Paraud et al. 2016). Dans cet élevage de l'Allier, une diminution de l'efficacité de l'ivermectine et de la moxidectine a été constatée chez des agnelles. Une infestation expérimentale puis un bilan parasitaire ont permis de confirmer l'hypothèse émise suite aux tests de laboratoire, et d'identifier *T. circumcincta* comme espèce résistante.

**Tableau 11** : Enquêtes sur la prévalence de la résistance aux anthelminthiques en France.

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'élevage dans lequel un type de résistance a été démontré par rapport au nombre total d'élevages étudiés.

Département	Benzimidazoles	Lévamisole	Lactones macrocycliques	Référence
Deux-Sèvres	82% (19/23)	50% (9/18)	0% (0/21)	Chartier et al., 1998
Aveyron	100% (5/5)	NE	0% (0/5)	Geurden et al., 2014
Pyrénées-Atlantiques	100% (5/5)	NE	0% (0/5)	Geurden et al., 2014
Loire/Allier	NE	NE	50% (1/2)	Paraud et al., 2014

Ces études récentes dressent un tableau préoccupant de la situation des résistances en France. Si l'efficacité des benzimidazoles est désormais restreinte, les lactones macrocycliques demeurent, dans la plupart des cas, efficaces. Ces observations doivent conduire les vétérinaires comme les éleveurs à reconsidérer leurs pratiques de traitements. La lutte intégrée contre la diffusion des résistances est aujourd'hui primordiale afin de ne pas subir les conséquences dramatiques observées dans les élevages anglo-saxons d'Europe ou d'Océanie (Jacquiet, Fidelle, et al. 2014).

### **3. Prévention de l'apparition des résistances : l'utilisation raisonnée des anthelminthiques**

Après l'apparition de résistance dans un élevage, il n'a jamais été observé de réversion de celle-ci, même après un arrêt total de l'utilisation des anthelminthiques concernés pendant plusieurs années (Wolstenholme et al. 2004, Cabaret 2012). Il est donc nécessaire d'appliquer des mesures en élevage pour prévenir l'apparition de résistances, ou, le cas échéant, pour ralentir leur progression dès lors que les tests les ont détectées.

#### 3.1. La gestion de la charge parasitaire

##### 3.1.1. La notion de « refuge »

La notion de « refuge » a été définie au début des années 2000 et est désormais reconnue comme étant le concept fondamental de la lutte contre les résistances. Le principe est de conserver une population conséquente d'individus sensibles, de manière à « diluer » les allèles de résistances parmi les allèles sauvages et donc freiner la diffusion de la résistance au sein des populations de SGI (Besier 2012).

La population refuge est la population qui n'est pas soumise à la pression de sélection des anthelminthiques lors d'un traitement. Elle est constituée par les stades larvaires libres dans l'environnement, les larves en hypobiose dans le tube digestif de l'hôte (sauf en cas d'emploi de lactones macrocycliques) et les adultes parasitant les animaux non-traités (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

En pratique, la taille de la population refuge doit être prise en compte à chaque décision de traitement. Par exemple, le traitement de tout le troupeau lors de la remise à l'herbe en début de printemps diminue fortement la taille de la population refuge. A cette période, peu de larves infestent les prairies et le refuge est presque exclusivement constitué des stades parasitaires dans le tube digestif. A l'inverse, un traitement lors du pic larvaire d'été est moins préjudiciable puisque les stades libres constituant le refuge sont abondants (Jacquiet, Fidelle, et al. 2014). Il a été évalué à l'aide de modèles mathématiques que deux traitements sur des pâtures peu contaminées développent des résistances aussi vite que

cinq traitements sur des pâtures présentant un niveau de contamination élevée (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

Le maintien d'une population refuge de grande taille est efficace dans la lutte contre la propagation des résistances, mais nécessite des compromis : il faut accepter un certain risque parasitaire, effectuer moins de traitement mais aux moments opportuns et cibler en priorité les animaux les plus fragiles.

### 3.1.2. Application de traitements ciblés et sélectifs

Le traitement anthelminthique raisonné consiste à ne pas traiter tous les animaux au même moment. Les traitements ciblés concernent l'ensemble d'un lot en particulier. La question sous-jacente est dans ce cas « quand faut-il traiter ? ». Pour cela, parmi les indicateurs du niveau de parasitisme, la coproscopie de mélange offre les meilleurs résultats. On peut par exemple décider de traiter un lot lorsque la moyenne de l'excrétion fécale d'œuf dépasse un seuil prédéfini (Bonfont, Canellas 2014).

Cette méthode est intéressante car elle permet de détecter les animaux fortement excréteurs, et donc de ralentir la contamination des pâtures. Son principal inconvénient réside dans le fait que le traitement n'est pas forcément appliqué aux animaux présentant des signes cliniques de parasitisme. En effet, l'intensité de l'excrétion fécale n'est pas corrélée à la résilience, donc des animaux fortement excréteurs peuvent très bien tolérer un niveau de parasitisme élevé (Besier 2012).

Une autre stratégie consiste à traiter les animaux les moins résilients, quel que soit le lot. On parle alors de traitements sélectifs, et l'on se base sur les indicateurs cliniques présentés dans la première partie pour détecter les animaux présentant réellement des symptômes du parasitisme. Parmi ces indicateurs, le score FAMACHA® est intéressant pour détecter les animaux anémiés suite aux infestations par *H. contortus*. Dans le cas des strongyloses à *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, majoritaires en France métropolitaine, il est plus pertinent d'utiliser l'index DISCO et l'évolution du GMQ et de la NEC pour détecter les animaux les moins résilients (Torres-Acosta, Hoste 2008, Jacquet 2015).

## 3.2. Applications des bonnes pratiques d'utilisation des anthelminthiques

### 3.2.1. Administration de doses adaptées

Le sous-dosage étant une cause fréquemment rapportée de développement de résistance, il est essentiel d'administrer des doses adaptées selon l'anthelminthique utilisé et l'animal à traiter :

- La posologie et la voie d'administration indiquées sur le mode d'emploi du médicament doivent être scrupuleusement respectées.
- Les pistolets-droqueurs doivent être correctement calibrés.
- La dose administrée à un lot est déterminée à partir du poids de l'animal le plus lourd du lot.
- Les animaux doivent être si possible à jeun depuis 12h au moment du traitement. En effet, le jeûne augmente la biodisponibilité des BZ et LM de 40%, et entraîne une diminution du pH abomasal favorable à la persistance des BZ dans la caillette (Autef 2015).
- La dose est appliquée derrière le torus lingual afin d'éviter la fermeture de la gouttière œsophagienne. Les BZ étant plus efficaces s'ils transitent préalablement dans le rumen, ceci permet d'éviter un passage directement dans la caillette (Autef 2015).
- Les conditions de stockage du médicament et la date de péremption doivent être vérifiées avant chaque utilisation.

Si l'absence d'efficacité d'un anthelminthique est constatée, il est indispensable de s'assurer que les consignes précédentes aient été respectées avant de suspecter l'existence d'une résistance (Torres-Acosta, Hoste 2008).

### 3.2.2. Alternance et combinaison de familles d'anthelminthiques

- *Alternance de famille d'anthelminthiques*

Afin de limiter la pression de sélection exercée par l'utilisation d'une seule famille d'anthelminthiques, il est conseillé d'alterner les familles de molécules chaque année, voir à chaque traitement. Les molécules récentes, le monépanel et le derquantel, quand elles sont disponibles commercialement, ne doivent pas être utilisés en seconde intention mais

intégrés à la rotation des anthelminthiques afin de retarder l'apparition des résistances aux molécules plus anciennes (Vandaël 2010).

La rotation des anthelminthiques a été évoquée initialement pour permettre la réversion de la résistance pendant la durée de non-utilisation d'une molécule. Aujourd'hui, dans les élevages où des résistances sont avérées, l'intérêt de cette pratique est remis en question puisque la réversion n'a jamais été observée. Certains auteurs préconisent d'avantage la combinaison de plusieurs anthelminthiques (Fleming et al. 2006).

- *Combinaison de traitements anthelminthiques*

L'utilisation de combinaison d'anthelminthiques à large spectre et au mode d'action différent a été proposée afin de prévenir l'apparition de résistance. En dehors de toute pression de sélection, la probabilité qu'une population ait acquis des allèles de résistance simultanément à différentes familles d'anthelminthique est très faible. Ainsi, la majorité des strongles sera éliminée par une des molécules utilisées dans la combinaison à chaque traitement (Cabaret 2012).

Cette méthode permet également un contrôle du parasitisme en cas de résistance à plusieurs familles d'anthelminthiques par des populations distinctes (Bartram et al. 2012). Si l'on considère une formulation contenant deux molécules A et B, la molécule A éliminera les strongles résistants à la molécule B et la molécule B éliminera les strongles résistants à la molécule A.

Il est nécessaire de s'assurer régulièrement de l'efficacité des anthelminthiques utilisés en rotation ou en combinaison par des tests de laboratoire (voir 4.). Si les résistances sont détectées précocement, les mesures pour ralentir leur progression seront plus efficaces et l'efficacité de l'anthelminthique pourra être prolongée.

### 3.2.3. Association des anthelminthiques et de la gestion des pâtures

Les méthodes de gestion du pâturage permettent rarement à elles seules un contrôle satisfaisant des strongyloses, mais leur association aux anthelminthiques de synthèse a pour objectif la réduction de l'utilisation de ces derniers : on parle de lutte intégrée. Les mesures préventives décrites précédemment (cf Partie 1, 5.) visent à limiter les interactions entre les

ovins et les stades larvaires afin de prévenir les infestations massives. Elles participent également à l'acquisition de l'immunité des jeunes en autorisant une faible exposition aux SGI (Chartier, Camuset 2012).

Pendant longtemps, il a été pratiqué la méthode du « *Dose and Move* » : le déplacement des animaux sur une parcelle saine juste après un traitement anthelminthique permettait de retarder les réinfestations. Depuis l'apparition des résistances en élevage, cette pratique est fortement déconseillée puisque la population refuge est inexistante sur une parcelle saine (cf 3.1.1). Des alternatives limitant la pression de sélection ont été proposées :

- Le « *Move then Dose* » : cette méthode permet une légère contamination de la parcelle saine par des individus sensibles avant traitement, ce qui constitue une population refuge permettant la dilution des allèles de résistance (Torres-Acosta, Hoste 2008).

- Délai entre le « *Dose* » et le « *Move* » : Les ovins sont déplacés sur la parcelle saine quelques jours à une semaine après le traitement. Ce délai permet une réinfestation des ovins sur la parcelle d'origine, puis par la suite une contamination de la parcelle saine par une population sensible qui constituera le refuge (Abbott, Taylor, Stubbings 2012). Cette méthode n'est pas applicable avec l'utilisation de molécules rémanentes comme la moxidectine ou le closantel.

#### 3.2.4. Mesures de quarantaine suite à l'introduction d'animaux

Les animaux introduits dans un élevage doivent être placés en quarantaine et être traités avec une combinaison de deux à trois anthelminthiques, afin d'éliminer la majorité des allèles de résistance provenant de l'élevage d'origine (Papadopoulos 2008). Ils doivent être maintenus par la suite hors du troupeau pendant 48h, afin que les œufs produits avant traitement soient complètement éliminés dans les matières fécales. Pour finir, ils sont nécessairement introduits sur une parcelle contaminée, afin de diluer les génotypes multi-résistants des individus qui auront éventuellement survécu aux différents anthelminthiques administrés (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

## **4. Identification des résistances en élevage ovin**

Toute suspicion de résistance aux anthelminthiques émise en élevage doit être confirmée par des tests de laboratoires. Certains sont effectués directement sur l'hôte (tests *in-vivo*) tandis que d'autres sont effectués à partir du prélèvement d'éléments parasitaires (œufs ou larves, tests *in-vitro*).

### 4.1. Mise en évidence de la résistance *in-vivo*

#### 4.1.1. Le FECRT (*Fecal Egg Count Reduction Test*)

Le FECRT est le principal test de détection de résistance *in-vivo*, car il est simple à mettre en œuvre en élevage et permet d'identifier des résistances à toutes les familles d'anthelminthiques pour toutes les espèces de strongles gastro-intestinaux. Ce test propose une estimation indirecte de l'efficacité d'un anthelminthique en comparant l'intensité de l'excrétion fécale d'œufs après traitement à celle avant traitement, ou par rapport à un groupe non-traité.

- *Réalisation*

Les recommandations suivantes proviennent du consensus établi par la *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P)*, et doivent être respectées pour que le test FECRT soit interprétable et représentatif :

- Les lots doivent être constitués aléatoirement d'au moins 10 animaux chacun, idéalement 15.

- Les animaux sont si possibles âgés de 3 à 6 mois et les excréments fécaux individuelles avant traitement doivent être supérieures à 150 opg. Ils ne doivent pas avoir été traités depuis moins de 3 mois.

- Pour chaque animal, 3 à 5 g de matières fécales sont prélevés directement dans le rectum, puis conditionnés et identifiés individuellement.

- Les prélèvements sont analysés aussi vite que possible par la technique de McMaster modifiée présentée dans la partie 1. Les prélèvements peuvent être conservés à 4°C si l'analyse n'est pas immédiate, mais au maximum 24h si des coprocultures sont effectuées par la suite.

- Les animaux sont traités avec l'anthelminthique à tester à la dose recommandée par le fabricant, selon le poids de l'animal le plus lourd du lot. Le traitement est administré par voie orale à l'aide d'une seringue idéalement, ou d'un pistolet drogueur correctement calibré.

- les prélèvements post-traitements sont effectués après un délai qui dépend de l'anthelminthique concerné : 3-7 j pour le lévamisole, 8-10 jours pour les benzimidazoles, 14-17 jours pour les lactones macrocycliques. Ce délai est appliqué en raison d'une inhibition de ponte suite aux traitements, pouvant être à l'origine de faux-négatifs. Lorsque plusieurs anthelminthiques sont testés, un prélèvement de l'ensemble des lots à 14 jours post-traitement est un compromis raisonnable (Coles et al. 1992).

- *Calcul du FECR*

Plusieurs méthodes ont été proposées pour le calcul du FECR. Dans sa forme la plus rigoureuse (FECR<sub>1</sub>), le FECR est évalué avec la moyenne arithmétique des FEC des individus du lot traité avant (T1) et après traitement (T2), et d'un lot contrôle non traité avant (C1) et après traitement des autres lots (C2).

$$- \text{FECR}_1 = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{T_2}{T_1} \times \frac{C_1}{C_2} \right) \right]$$

Des méthodes de calculs simplifiés de FECR ont été développées pour faciliter l'application de ce test en élevage. Elles s'affranchissent ainsi des FEC pré-traitement (FECR<sub>2</sub>) ou du lot contrôle (FECR<sub>3</sub>) (McKenna 2006).

$$- \text{FECR}_2 = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{T_2}{C_2} \right) \right]$$

$$- \text{FECR}_3 = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{T_2}{T_1} \right) \right]$$



La méthode incluant le groupe contrôle permet de prendre en compte l'évolution naturelle de l'excrétion des animaux, mais les FEC initiaux des groupes contrôles et traités doivent être homogènes pour pouvoir être comparés.

La méthode comparant les FEC pré et post-traitement permet d'exclure les animaux excréant initialement moins de 150 opg, et autorise la réalisation de coproculture différentielles pour l'identification des espèces résistantes aux anthelminthiques testés (Coles et al. 2006).

Une étude portant sur 210 FECRT n'a pas mis en évidence de différence significative concernant la détection de résistance entre les différents types de FECR (McKenna 2006).

- *Interprétation et limites du FECRT*

Selon les recommandations de la WAAVP, une résistance est mise en évidence si le FECR est inférieur à 95%, et si la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% est inférieure à 90%. Si un seul de ces deux critères est vérifié, alors la résistance est suspectée (Coles et al. 1992).

Le détail du calcul de l'IC à 95% est fourni dans l'annexe 5. Il a été montré que lorsque le FECR est inférieur à 95%, la limite inférieure de l'IC à 95% est toujours inférieure à 90% (McKenna 1994).

Le FECRT est simple à réaliser en routine et mais comporte plusieurs limites :

- La détection est tardive puisque les résistances sont identifiées lorsque qu'il y a plus de 25% d'allèles de résistance dans une population (Papadopoulos 2008).

- L'interprétation du test dépend de la prolificité des espèces. Par exemple, si l'on considère un hôte infesté par une population sensible de *H. contortus* et par une population résistante de *T. circumcincta*, le FECR pourrait être supérieur à 95% suite à l'élimination de *H. contortus*, espèce à forte prolificité. La population résistante de *T. circumcincta* ne serait pas détectée en raison de sa plus faible fécondité (Autef 2015).

En raison des limites du FECRT, une résistance mise en évidence à l'aide de ce test doit souvent être confirmée par un bilan parasitaire suite à une infestation expérimentale, notamment pour confirmer les résistances aux lactones macrocycliques en Europe.

#### 4.1.2. Infestations expérimentales (*Controlled Anthelmintic Efficacy Test*)

Ce test est le test de référence pour l'évaluation des résistances aux anthelminthiques, notamment suite à une suspicion émise avec le FECRT.

Des coprocultures sont effectuées à partir des prélèvements de matières fécales réalisés dans l'élevage, puis les L3 infestantes obtenues sont inoculées à des agneaux naïfs non-infestés. Trente jours après l'inoculation, lorsque l'infestation est patente, des lots contrôles et traités sont constitués. Dix jours après les traitements, les animaux sont abattus et un comptage des vers est effectué. La résistance est confirmée si la réduction du nombre d'adultes par rapport au lot témoin est inférieure à 90%, ou si plus de 1000 vers ont survécu au traitement (Taylor, Hunt, Goodyear 2002).

Bien que très efficace, cette méthode est longue, couteuse et nécessite le sacrifice des animaux. Elle n'est donc pas effectuée en élevage mais plus fréquemment lors de protocole de recherche (Papadopoulos 2008).

#### 4.2. Mise en évidence de résistance *in-vitro*

##### 4.2.1. Le *Egg Hatch Test (EHT)* et le *Test de Développement larvaire (LDT)*

- *Le Egg Hatch Test*

L'EHT est utilisé en laboratoire pour la détection des résistances aux benzimidazoles. Le principe est d'évaluer la capacité du thiabendazole à inhiber l'éclosion des œufs de SGI. Plusieurs concentrations de thiabendazole sont ajoutées à des solutions contenant des œufs fraîchement prélevés (< 3h) afin de déterminer la DL<sub>50</sub>, soit la dose pour laquelle 50% des œufs ne se développent pas. La dose discriminante, c'est à dire la dose pour laquelle 99% des œufs sont tués, peut également être recherchée. L'éclosion d'œufs lorsque la dose de thiabendazole est supérieure à la dose discriminante normale, évaluée à 0,1 µg/mL, est synonyme de résistance (Coles et al. 2006).

L'avantage de ce test est qu'il ne nécessite qu'un seul prélèvement de matière fécale par animal. Cependant, sa corrélation au FECRT est faible. De plus, ce test semble peu reproductible, et les résultats dépendent grandement du laboratoire effectuant l'analyse.

Comme le FECRT, ce test détecte les résistances lorsqu'au moins 25% des allèles d'une population sont des allèles de résistance (Papadopoulos 2008).

- *Le Test de Développement Larvaire*

Le TDL évalue la capacité des L1 à évoluer en L3 en présence de l'anthelminthique testé. Le TDL permet de détecter les résistances aux benzimidazoles, au lévamisole et aux lactones macrocycliques. Il s'effectue de la même manière que l'EHT mais les œufs ne nécessitent pas d'être frais.

Ce test est plus long à effectuer que l'EHT, mais est considéré comme plus sensible puisque des résistances peuvent être détectées lorsque 10% de la population larvaire est porteuse d'allèles de résistance. De plus, les L3 résistantes peuvent par la suite être identifiées (Papadopoulos 2008).

D'autres tests de laboratoire concernant les adultes sont à l'étude, comme le test d'inhibition de la motilité. Ces tests sont rarement utilisés en raison de l'absence de standardisation de protocoles expérimentaux à l'heure actuelle.

#### 4.2.2. Méthodes moléculaires de détection d'allèles de résistance

Les recherches actuelles se concentrent essentiellement sur le développement d'outils moléculaires pour la détection des résistances. Les méthodes moléculaires sont les tests les plus sensibles puisqu'ils sont applicables dès que 1% des individus d'une population sont résistants (Papadopoulos 2008).

La méthode PCR permet une multiplication spécifique de l'allèle de résistance aux BZ, responsable de la substitution de l'acide aminé 200 de la  $\beta$ -tubuline. Plus récemment, des méthodes ont été développées pour amplifier les autres allèles de résistance aux BZ évoqués précédemment. Les tests moléculaires de détection de résistances aux BZ ne sont pas toujours corrélés aux tests biologiques comme le FECRT, l'EHT et le LDT. En effet, il existe des mécanismes non-spécifiques qui confèrent des résistances aux BZ et résultant d'autres mutations que celles identifiées jusqu'à présent (Kotze, Prichard 2016).

Les méthodes moléculaires de détection de résistances aux autres anthelminthiques sont en cours d'étude. A l'avenir, ces tests permettront une détection précoce et procureront une aide considérable dans la lutte contre les résistances aux anthelminthiques, mais de nombreuses recherches sont encore à mener.



**PARTIE 3 : EVALUATION DE LA RESISTANCE AUX  
ANTHELMINTHIQUES DES STRONGLES GASTRO-  
INTESTINAUX DANS QUATRE ELEVAGES DE CORREZE**



## **1. Introduction**

En France, plusieurs études récentes ont rapporté l'existence de résistances aux anthelminthiques dans des élevages ovins de Nouvelle-Aquitaine (ex Poitou-Charentes) et du Sud-ouest (Pyrénées-Atlantiques et Aveyron, cf. tableau 11). Cependant, très peu d'études ont été menées dans les élevages ovins du Limousin.

Le bassin d'élevage du Limousin constitue la 1<sup>ère</sup> région française en nombre de brebis allaitantes. En particulier, l'élevage ovin de Corrèze est constitué de 40 000 reproductrices réparties dans 277 élevages comptant plus de 50 brebis. La plupart des élevages possèdent une activité mixte ovin viande/bovin viande, et les exploitations spécialisées comportent fréquemment des effectifs supérieurs à 500 brebis.

De nombreux élevages sont situés en zone de moyenne montagne, notamment sur le Plateau de Millevaches, dont les caractéristiques sont un climat rude, un sol acide et granitique et une végétation composée majoritairement de landes, de bruyère et de tourbière. Cette particularité de l'élevage corrézien favorise la représentation d'une race rustique et locale, la brebis limousine, particulièrement adaptée à ces conditions d'élevage.

L'étude présentée par la suite comporte deux objectifs :

- L'évaluation des résistances aux anthelminthiques dans quatre élevages ovins allaitants de Corrèze par la méthode du FECRT, afin de commencer à dresser le profil des résistances et des espèces de SGI impliquées dans un département où aucune enquête n'a été menée.
- La comparaison d'une méthode d'identification moléculaire qPCR avec la méthode d'identification morphologique de Van Wyk pour l'identification des espèces résistantes aux anthelminthiques utilisés.



## **2. Matériel et méthode**

### 2.1. Sélection des élevages participant à l'étude

Le Groupement de Défense Sanitaire de Corrèze (GDS19) et notamment sa directrice, le Dr Christelle Roy, sont à l'initiative de ce projet. En effet, il a été rapporté dans ce département l'utilisation systématique et répétée des molécules anthelminthiques au cours des deux dernières décennies en élevage ovin.

Initialement, douze élevages ovins adhérents au GDS19 ont été proposés pour intégrer l'étude. Ces élevages ont été présélectionnés sur la base du volontariat et en raison de suspicions de résistance aux anthelminthiques émises par l'exploitant ou son vétérinaire traitant. Par la suite, les critères d'inclusion de l'étude impliquent que les animaux soient en bergerie au moment des prélèvements, et qu'ils n'aient reçu aucun traitement anthelminthique dans les trois mois précédant la date de l'entrée en bergerie. Ainsi, cinq élevages sont finalement retenus, et un fut par la suite exclu en raison d'une charge parasitaire nulle au moment des prélèvements.

Deux élevages (A et B) sont situés en plaine dans l'ouest du département, à moins de 400m d'altitude, et deux (C et D) sont situés en moyenne montagne dans l'est du département, à 800m d'altitude (voir annexe 6). Les animaux sont au pâturage d'avril à décembre, et en bergerie durant l'hiver. La majorité des individus sont de races locales : Romane, Limousine, Blanche du Massif Central. Il est demandé dans chaque élevage le type de traitement anthelminthique, la date du dernier traitement, la fréquence et les doses habituellement utilisées, notamment lors de la dernière année (voir tableau 12). Les animaux constituant les lots sont préférentiellement des agnelles ou primipares, sauf dans l'élevage B où le nombre d'individus appartenant à ces catégories est insuffisant pour l'étude.

Tableau 12 : Description des élevages sélectionnés

Elevage et localisation	Effectif	Race	Lots étudiés	Traitements au cours de l'année
<b>A</b> : Lagraulière	494	Romane, Limousine x Suffolk, Limousine x Berrichon	Agnelles de moins de 1 an	<b>Moxidectine</b> injectable (05/15), <b>Netobimim</b> (10/15)
<b>B</b> : Soudaine-Lavinadière	286	Ile-de-France x Hampshire	Brebis de 2 à 3 ans	<b>Méabendazole</b> + <b>Closantel</b> (05/15), <b>Nétobimim</b> (11/15)
<b>C</b> : Saint-Sulpice-les-Bois	421	Limousine	Primipare entre 1 et 1 an et demi	<b>Closantel</b> (06/15), <b>Moxidectine</b> injectable (09/16)
<b>D</b> : Eygurande	374	Blanche du Massif Central	Agnelles de moins de 1 an	<b>Moxidectine</b> orale (10/15)

## 2.2. Protocole expérimental en élevage

Lors de cette étude, le FECRT utilisé pour la détection de résistance s'appuie sur la comparaison des FEC de lots traités par rapport au FEC d'un lot contrôle non-traité, selon le protocole recommandé par la WWAVP (Coles et al. 1992). Des prélèvements individuels de matière fécale sont effectués à J0 puis l'animal est traité avec un anthelminthique à tester. Un prélèvement est de nouveau effectué 14 jours plus tard puis le FECR est calculé.

### 2.2.1. Constitution des lots

Dans les élevages A, B et C, 40 individus appartenant à une même catégorie d'âge sont sélectionnés et répartis aléatoirement en 4 lots de 10 animaux : un lot contrôle, un lot traité avec du fenbendazole, un lot traité avec de l'ivermectine et un lot traité avec de la moxidectine. Dans l'élevage D, les 4 lots sont constitués de 7 individus chacun en raison du plus faible nombre d'animaux disponibles pour l'étude.

Les catégories constituant les lots sont préférentiellement des animaux non-matures immunologiquement, soit des agnelles ou des primipares. Les animaux sélectionnés dans

l'élevage B sont plus âgés car le nombre d'individus en bergerie appartenant aux catégories précédentes est insuffisant pour l'étude. Les catégories d'animaux étudiées dans chaque élevage sont précisées dans le tableau 12. Aucun animal sélectionné n'a reçu de traitement anthelminthique dans les 3 mois qui précèdent le début de l'étude. Chaque animal est identifié en fonction de l'élevage et du lot attribué.

Il est parfois conseillé de réaliser des coproscopies individuelles au préalable sur les animaux testés. Ceci permet de s'assurer que la charge parasitaire des animaux est suffisante pour l'étude, et permet la réalisation de lots d'individus dont l'excrétion fécale d'œufs est homogène. Ces manipulations n'ont pu être réalisées dans cette étude par manque de temps.

### 2.2.2. Administration des traitements

Lors de la première visite (J0), les animaux les plus lourds de chaque lot sont pesés à l'aide d'une balance à bétail, puis la dose correspondante à l'animal le plus lourd du lot est administrée à chaque animal du lot. Le lot contrôle ou témoin (T) est traité avec de l'eau courante provenant de l'élevage, le lot (P) avec du fenbendazole (Panacur 2,5%® 5 mg/kg voie orale), le lot (O) avec de l'ivermectine (Oramec® 0,2 mg/kg voie orale) et lot (C) avec de la moxidectine (Cydectine 0,1%® 0,2 mg/kg voie orale).

Chaque traitement est administré à l'aide d'une seringue B.Braun® 20 mL. L'animal est immobilisé par l'éleveur au niveau du cou puis la dose administrée derrière le torus lingual par le manipulateur.

### 2.2.3. Prélèvement des brebis

A J0, un prélèvement individuel de matière fécale est effectué sur chaque individu. 5 à 10 grammes de matière fécale sont prélevés directement dans le rectum puis conditionnés et identifiés individuellement pour la réalisation des coproscopies individuelles. Par la suite, une partie de chaque prélèvement est placée dans des gobelets pour la réalisation de coproculture de mélange, soit une par lot.

A J14, les individus étudiés sont de nouveau prélevés de la même manière que précédemment. La boucle de l'animal associée au code individuel attribué pour l'étude permet la comparaison des coprologies avant et après traitement pour chaque animal. On obtient un nombre total de  $(2 \times 3 \times 4 \times 10) + (2 \times 4 \times 7) = 296$  coproscopies, soit 148 analyses pré-traitement et 148 analyses post-traitement. De même, on obtient  $2 \times 4 \times 4 = 32$  pots à coprocultures, 16 coprocultures pré-traitement et 16 coprocultures post-traitement.

## 2.3. Exploitation des prélèvements au laboratoire

### 2.3.1. Coproscopies et calcul du FECR

Les prélèvements sont réfrigérés à +4°C le temps des manipulations (2 jours par visite), puis analysés au laboratoire immédiatement après. Les coproscopies quantitatives sont réalisées selon la méthode de MacMaster modifiée par Raynaud, dont le protocole a été décrit dans la 1<sup>ère</sup> partie de cette thèse (3.2.1).

Il a été choisi ici de calculer les FECR en comparant les FEC du lot traité à J14 avec les FEC du lot contrôle à J14.

On a ainsi :

$$\text{FECR} = 100 \times \left[ 1 - \left( \frac{\text{OPG traité à J14}}{\text{OPG contrôle à J14}} \right) \right]$$

### 2.3.2. Réalisation des cultures larvaires

Les gobelets à coprocultures constitués précédemment sont conservés à température ambiante pendant la durée des manipulations, puis placés dans un incubateur à  $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 12 jours et humidifiés à l'aide d'une pissette d'eau tous les 2 jours. Après ces 12 jours d'incubation, les L3 sont extraites à l'aide de la technique MAFF 1986 décrite dans la partie 1 (3.2.2.), placées dans un volume total de 45 mL puis centrifugés à 4500 tours/minutes pendant 10 minutes, permettant ainsi leur concentration dans un volume final de 5 mL. Les suspensions larvaires ainsi obtenues (une par coproculture) sont par la suite placées au réfrigérateur à +4°C jusqu'au dénombrement et à l'identification des L3.

### 2.3.3. Manipulations préalables à l'identification moléculaire des L3 par qPCR

- *Contrôles positifs utilisés pour évaluer la spécificité des réactions PCR*

Trois isolats de L3 d'espèces différentes sont utilisés en tant que contrôle positifs des réactions PCR : une souche de *H. contortus* (Humeau, sud-ouest de la France), une souche de *T. circumcincta* (Le Merle, sud de la France) et une souche de *T. colubriformis* (Weybridge, Royaume-Uni). Les L3 de ces souches proviennent de coprocultures effectuées à partir d'agneaux maintenus en bergerie afin d'éviter des contaminations par d'autres espèces.

De plus, des individus adultes de cinq espèces (*H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis*, *C. curticei* et *O. venulosum*) ont été prélevés dans un abattoir (Pays-Basque, France) dans le tube digestif d'agnelles provenant de deux élevages du sud-ouest de la France. Ces vers ont été lavés puis identifiés à *posteriori* selon les recommandations existantes (MAFF 1986).

- *Extraction de l'ADN des L3 et adultes*

L'extraction de l'ADN des L3 et des adultes est effectuée en utilisant le kit PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, St-Quentin-en-Yvelines, France) selon les recommandations du fabricant, à partir d'un échantillon de 500 µL pour chaque suspension parasitaire. Après extraction, les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

- *Caractérisation de la réaction PCR*

Toutes les manipulations sont réalisées selon une méthode PCR en temps réel utilisant la technologie *Taqman*, dont le principe a été présenté lors de la 1<sup>ère</sup> partie. Les réactions PCR sont effectuées en Simplex (un seul type d'amorces et de sondes par puits) afin d'éviter les hybridations non-spécifiques et les compétitions entre les amorces et sondes. L'automate utilisé était le Mx3005P (Agilent Technology, La Jolla, CA, USA) avec les étapes suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min (activation de la Taq-polymérase), puis amplification lors de 45 cycles constitués chacun de 30 secondes à 95°C (dénaturation des brins d'ADN) et 1 min à 53°C (hybridation des amorces et sondes et

élongation). Les résultats sont analysés grâce au logiciel MxPro QPCR v4.10 software (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA).

Chaque puits contient 2,5 µL d'ADN à amplifier, 10 µM (0,5 µL) d'amorce *Reverse* (3'), 10 µM (0,5 µL) d'amorce *Forward* (5'), 2 µM (1µL) de sonde spécifique, 10 µL de réactif iQ Multiplex Power Mix (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) et 5,5 µL d'eau BSA (Bovine Serum Albumin) pour un volume final de 20 µL.

- *Vérification de la spécificité des amorces et sondes PCR*

Dans un premier temps, il est utilisé les amorces *Forward* et les sondes *TaqMan* fluorescentes proposées par McNally et *al.* (McNally et *al.* 2013), spécifiques de chaque espèce. L'amorce *Reverse* utilisée, le NC2, est universelle (Gasser et al. 1993). Les amorces et sondes choisies permettent l'amplification spécifique du gène ITS-2 de l'ADN ribosomal, dont la séquence est très spécifique d'une espèce donnée de SGI et varie peu parmi les individus de cette espèce.

La spécificité des amorces et sondes de McNally est étudiée dans cette étude sur l'ADN extrait à partir de 1000 L3 pour chaque isolat présenté précédemment. En raison de l'observation de deux interactions non-spécifiques (amorce *Forward* de *T. circumcincta* avec sonde et ADN de *H. contortus*, et amorces *Forward* de *T. colubriformis* avec sonde et ADN de *H. contortus*, voir annexe 7), de nouvelles amorces *Forward* utilisant la technologie LNA (*Locked Nucleic Acid*, renforcement de la stabilité de l'amorce sur l'ADN) sont utilisées (annexe 8). Par la suite, les nouvelles combinaisons d'amorces et de sondes sont testées sur les mêmes échantillons sans qu'il ne soit observé d'interaction non-spécifique, chaque amorce et sonde s'hybridant sur la séquence adéquate. Il est donc supposé que les amorces de McNally soient spécifiques des espèces de SGI de souches australiennes, mais moins adaptées aux espèces de souches européennes.

Les amplicons obtenus à partir des trois espèces étudiées, d'environ 200 paires de base, sont séquencés au laboratoire Génome et Transcriptome de Purpan (Federative Institute for Bio-Medical Research, Toulouse, France). Le séquençage permet de confirmer que chaque amplicon est constitué de la séquence d'ADN appropriée selon l'espèce.

Par la suite, les amorces LNA et les sondes sont testées sur l'ADN des individus adultes prélevés dans le tube digestif des agnelles à l'abattoir. Seule une faible hybridation non-spécifique survient entre les sondes et amorces spécifiques de *H. contortus* et l'ADN d'une femelle de l'espèce *O. venulosum* (voir annexe 9).

- *Sensibilité de détection et répétabilité des manipulations*

La sensibilité de la réaction PCR est évaluée en testant l'amplification de la quantité d'ADN équivalente à 7 L3 d'une espèce donnée, mélangée à la quantité d'ADN équivalente à 250 L3 de chacune des 2 autres espèces. Les Cq obtenus indiquent une détection satisfaisante d'une petite quantité d'ADN spécifique au sein d'un mélange d'ADN de différentes espèces.

Tableau 13 : Cq de chaque espèce lorsque l'ADN de celle-ci est minoritaire dans un mélange

	Amorces et sondes <i>H. contortus</i>		Amorces et sondes <i>T. circumcincta</i>		Amorces et sondes <i>T. colubriformis</i>	
	Equivalent ADN	Cq ( <i>H. contortus</i> )	Equivalent ADN	Cq ( <i>T. circumcincta</i> )	Equivalent ADN	Cq ( <i>T. colubriformis</i> )
<i>H. contortus</i>	7 L3	27,4	250 L3	29,8	250 L3	29,8
<i>T. circumcincta</i>	250 L3		7 L3		250 L3	
<i>T. colubriformis</i>	250 L3		250 L3		7 L3	

La répétabilité des manipulations PCR est testée en évaluant le Cq de la réaction PCR pour des quantités d'ADN équivalentes à 500, 62 et 7 L3 pour les espèces *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, lors de 4 répétitions successives. Les répétitions sont effectuées dans les mêmes conditions et par le même manipulateur à des dates différentes. Les moyennes arithmétiques, les écarts-types ainsi que les coefficients de variations (*écart-type divisé par moyenne arithmétique x 100*) des Cq sont calculés pour chaque espèce. Les coefficients de variations varient de 1,3% (7 L3 de *T. circumcincta*) à 4,4% (500 L3 de *H. contortus*) et traduisent une bonne répétabilité des manipulations (voir annexe 10).

- *Détermination des courbes standards de chaque espèce*

Pour *H. contortus* et *T. colubriformis*, 3 échantillons de 2000 L3 provenant des isolats sont préparés pour chaque espèce. L'ADN de chaque échantillon est extrait puis dilué en série dans le même volume d'eau stérile (ratio 1 :1) de manière à obtenir par échantillon huit concentrations d'ADN équivalentes à 1000, 500, 250, 125, 62, 30, 15 et 7 larves. Pour *T. circumcincta*, 3 échantillons de 500 L3 sont préparés. De la même manière, il est réalisé des dilutions d'ADN équivalentes à 250, 125, 62, 30, 15 et 7 larves.

Les réactions PCR nécessaires à la construction de la courbe standard de chaque espèce à partir des isolats sont réalisées 3 fois chacune, et le Cq moyen pour chaque dilution est calculé. Une régression linéaire permet de déterminer l'équation suivante :

$$\underline{Cq\ moyen = p \times \log(\text{nombre de larve}) + a}$$

On obtient par la suite :

$$\text{- } H. \textit{ contortus} : \quad n(\text{larves}) = 10^{\frac{Cq - 26,647}{3,272}}$$

$$\text{- } T. \textit{ circumcincta} : \quad n(\text{larves}) = 10^{\frac{Cq - 31,188}{3,747}}$$

$$\text{- } T. \textit{ colubriformis} : \quad n(\text{larves}) = 10^{\frac{Cq - 31,119}{3,9288}}$$

où n(larves) est le nombre de larves de l'espèce considérée dans un échantillon, estimé par la valeur de Cq obtenue.

L'efficacité de la PCR est calculée selon l'équation suivante :  $\underline{\text{Eff PCR (\%)} = 10^{(-1/p)}}$ . L'efficacité a été évaluée à 102% pour *H. contortus*, 85% pour *T. circumcincta* et 80% pour *T. colubriformis*. Les gammes étalons sont fournies dans l'annexe 11.

#### 2.3.4. Dénombrement et identification morphologique des larves L3

Le nombre de larves par millilitre de suspension larvaire est estimé en comptant à l'aide d'un microscope toutes les L3 contenues dans 2 volumes de 40 µL prélevés aléatoirement. La proportion des espèces de chaque lot est déterminée en examinant 100 L3



de chaque suspension larvaire. L'identification spécifique des larves est effectuée selon la technique de Van Wyk présentée lors de la 1<sup>ère</sup> partie (3.2.2.) :

- la longueur de l'extension caudale de la gaine est mesurée afin de distinguer trois différents types de L3 : *Teladorsagia/Trichostrongylus*, *Haemonchus/Cooperia* et *Oesophagostomum/Chabertia*.

- la présence de deux corps réfringents à l'extrémité crâniale des L3 de *Cooperia* permet leur identification (voir annexe 4), et donc l'identification des L3 de *Haemonchus contortus* par soustraction.

#### 2.3.5. Dénombrement et identification moléculaire par qPCR des larves L3

Les caractéristiques des réactions PCR et la composition des puits sont les mêmes que celles décrites dans la partie précédente. Chaque réaction PCR est effectuée en présence d'un témoin négatif (eau BSA sans ADN) et de témoins positifs (ADN équivalent à 500, 125 et 7 L3 de l'espèce à amplifier). Le nombre total de larves par mL est calculé en sommant le nombre de larves de chaque espèce obtenu à partir des Cq des réactions PCR spécifiques. Les proportions relatives des espèces ont été établies pour chaque suspension larvaire.

### 3. Résultats

#### 3.1. Coproscopies

##### 3.1.1. Résultats du FECRT

Les FEC moyens des lots J0 et J14 et les FECR par rapport au lot contrôle sont résumés dans le tableau 13. Seuls les animaux avec un FEC supérieur ou égal à 150 opg à J0 ont été pris en compte dans les calculs ( $n$ ). Pour chaque élevage, les FEC individuels et le détail des calculs des intervalles de confiance sont fournis en annexe 12, 13, 14 et 15.

Tableau 14 : FECR et intervalles de confiance à 95% des lots étudiés

Lot	Résultat	Elevage A		Elevage B		Elevage C		Elevage D	
		J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14
Contrôle	FEC moyen (opg)	578,6	464,3	805,6	794,4	350	450	150	100
		$n = 7$		$n = 9$		$n = 2$		$n = 1$	
	FECR (%)								
	IC 95% (%)								
Fenbendazole (Panacur®)	FEC moyen (opg)	1035,7	407,1	1227,8	844,4	225	75	200	0
		$n = 7$		$n = 9$		$n = 2$		$n = 2$	
	FECR (%)	<b>12,3</b>		<b>- 6,3</b>		<b>83,3</b>		<b>100</b>	
	IC 95% (%)	<b>[-59,5 ; 51,8]</b>		<b>[-130 ; 50,9]</b>		<b>[23,3 ; 96,4]</b>		<b>-</b>	
Ivermectine (Oramec®)	FEC moyen (opg)	428,6	1,9	794,4	127,2	150	0	1171,4	0
		$n = 7$		$n = 9$		$n = 1$		$n = 7$	
	FECR (%)	<b>99,6</b>		<b>84</b>		<b>100</b>		<b>100</b>	
	IC 95% (%)	<b>[95,7 ; 99,9]</b>		<b>[66,2 ; 92,4]</b>		<b>-</b>		<b>-</b>	
Moxidectine (Cydectine®)	FEC moyen (opg)	1007,1	9	633,3	16,7	425	0	758,3	0
		$n = 7$		$n = 9$		$n = 2$		$n = 6$	
	FECR (%)	<b>98,1</b>		<b>97,9</b>		<b>100</b>		<b>100</b>	
	IC 95% (%)	<b>[94,4 ; 99,9]</b>		<b>[90,0 ; 99,6]</b>		<b>-</b>		<b>-</b>	

### 3.1.2. Interprétation des FECRT

- Les FECR après traitement avec le fenbendazole varient de -6,3% à 100%. En considérant les critères de résistance détaillés précédemment (Partie 2, 4.1.1.), une résistance au fenbendazole est identifiée dans les élevages A, B et C (FECR < 95% et borne inférieure de l'IC 95% < 90%).

- Les FECR après traitement avec l'ivermectine varient de 84% à 100%. Une résistance à l'ivermectine est identifiée dans l'élevage B en raison d'un FECR inférieur à 95% (84%) et d'une borne inférieure de l'IC 95% inférieure à 90% (66,2%). Aucune résistance à l'ivermectine n'est suspectée dans les trois autres élevages.

- L'efficacité de la moxidectine demeure élevée dans les quatre élevages, les FECR après traitement varient de 97,9% à 100%.

- L'élevage D est le seul des 4 élevages étudiés à ne pas présenter de résistance aux anthelminthiques testés suite au FECRT. Une résistance aux benzimidazoles est confirmée dans trois élevages sur quatre, tandis qu'une suspicion de résistance à plusieurs familles d'anthelminthiques est émise dans l'élevage B.

## 3.2. Cultures larvaires

### 3.2.1. Nombre de larves et proportions relatives des espèces de strongles par identification morphologique

Le nombre de L3 par mL de suspension larvaire ainsi que les proportions relatives des espèces identifiées sont résumés dans le tableau 14.

Parmi les trente-deux coprocultures réalisées, huit se révèlent négatives. Ces coprocultures correspondent pour sept d'entre elles à des lots traités pour lesquels l'excrétion fécale est presque nulle, mais l'une d'entre elle correspond au lot contrôle J0 de l'élevage D. La raison de l'échec du développement des L3 de cette culture est inconnue. De plus, une nette diminution du nombre de larve par mL est constatée à J14 par rapport à J0 pour les lots contrôles des élevages A et B. Les conditions de réalisation des coprocultures étant les mêmes à J0 et à J14, cette diminution reste également inexpliquée.

Tableau 15 : Dénombrement des larves et proportions relatives des différentes espèces obtenues par identification morphologique après coproculture pour chaque lot.

Lot	Nombre de larves par mL et proportions respectives	Elevage A		Elevage B		Elevage C		Elevage D	
		J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14
Contrôle	Nombre de larves / mL dont : (%)	1113	175	1438	100	400	625	0	13
	<i>H. contortus</i>	75	80	32	12	0	0	-	0
	<i>T. circumcincta</i> / <i>T. colubriformis</i>	25	20	66	76	94	96	-	100
	<i>Oesophagostomum</i> / <i>Chabertia</i>	0	0	2	12	6	0	-	0
	<i>Cooperia</i>	0	0	0	0	0	4	-	0
Fenbendazole (Panacur®)	Nombre de larves / mL dont : (%)	950	263	738	163	250	63	13	0
	<i>H. contortus</i>	66	43	17	31	0	0	0	-
	<i>T. circumcincta</i> / <i>T. colubriformis</i>	34	52	83	69	100	100	100	-
	<i>Oesophagostomum</i> / <i>Chabertia</i>	0	5	0	0	0	0	0	-
	<i>Cooperia</i>	0	0	0	0	0	0	0	-
Ivermectine (Oramec®)	Nombre de larves / mL dont : (%)	75	0	1525	50	225	0	1313	0
	<i>H. contortus</i>	50	-	20	0	6	-	2	-
	<i>T. circumcincta</i> / <i>T. colubriformis</i>	50	-	77	100	94	-	98	-
	<i>Oesophagostomum</i> / <i>Chabertia</i>	0	-	3	0	0	-	0	-
	<i>Cooperia</i>	0	-	0	0	0	-	0	-
Moxidectine (Cydectine®)	Nombre de larves / mL dont : (%)	1025	0	1238	25	88	0	325	0
	<i>H. contortus</i>	59	-	24	0	14	-	4	-
	<i>T. circumcincta</i> / <i>T. colubriformis</i>	38	-	75	100	86	-	96	-
	<i>Oesophagostomum</i> / <i>Chabertia</i>	2	-	1	0	0	-	0	-
	<i>Cooperia</i>	1	-	0	0	0	-	0	-

3.2.2. Nombre de larves et proportions relatives des espèces de strongles  
identifiées par qPCR

Le nombre de L3 dénombré par mL de suspension larvaire ainsi que les proportions relatives des espèces identifiées sont résumés dans le tableau 14.

Tableau 16 : Dénombrement des larves et proportions relatives des différentes espèces obtenues par identification moléculaire après coproculture pour chaque lot.

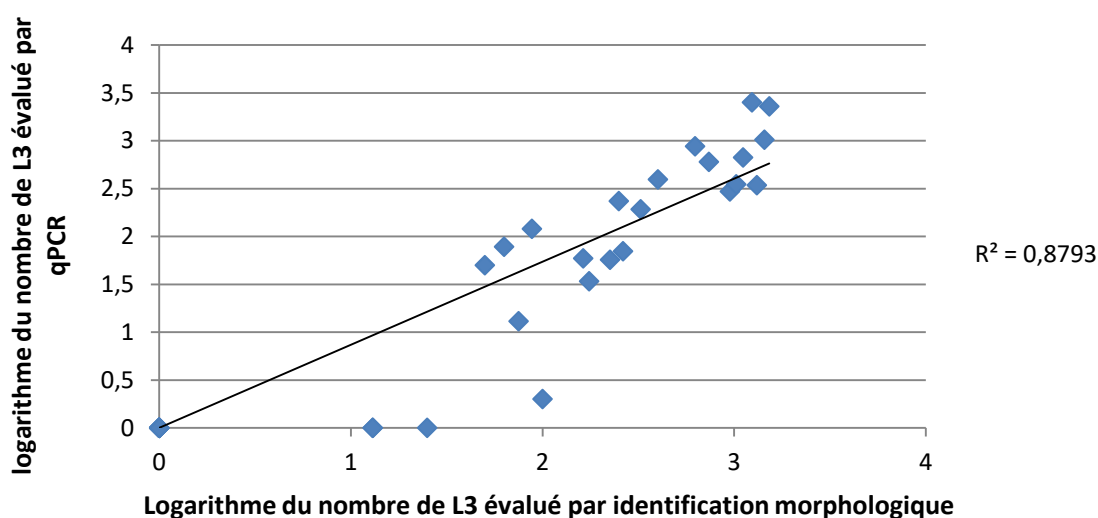
Lot	Nombre de larves par mL et proportions respectives	Elevage A		Elevage B		Elevage C		Elevage D	
		J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14
Contrôle	Nombre de larves / mL dont (%) :	668	34	1024	2	394	874	0	1
	<i>Haemonchus contortus</i>	48	45	22	0	0	0	-	0
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	14	10	50	50	27	50	-	0
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	38	45	28	50	73	50	-	100
Fenbendazole (Panacur®)	Nombre de larves / mL dont (%) :	295	70	601	59	234	78	14	0
	<i>Haemonchus contortus</i>	41	2	14	26	0	0	0	-
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	19	4	50	50	49	15	14	-
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	40	94	36	24	51	85	86	-
Ivermectine (Oramec®)	Nombre de larves / mL dont (%) :	13	0	2283	50	57	0	343	0
	<i>Haemonchus contortus</i>	12	-	13	10	0	-	0	-
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	17	-	56	87	77	-	22	-
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	71	-	31	3	23	-	78	-
Moxidectine (Cydectine®)	Nombre de larves / mL dont (%) :	350	0	2515	1	120	0	192	0
	<i>Haemonchus contortus</i>	47	-	16	100	1	-	1	-
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	25	-	79	0	75	-	6	-
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	28	-	5	0	24	-	93	-

### 3.3. Comparaison des deux méthodes d'identification larvaire

#### 3.3.1. Corrélacion du comptage total des L3 entre les deux méthodes

Une forte corrélation est notée entre le comptage microscopique et l'évaluation du nombre de larves par qPCR ( $r = 0,94$ ,  $p < 0,001$ , voir tableau 17).

**Tableau 17** : Corrélacion entre les deux méthodes de comptage des L3



#### 3.3.2. Corrélacion des proportions relatives des espèces

*Haemochus contortus* est la seule espèce dont les proportions peuvent être comparées entre les deux méthodes. Cette espèce fut détectée dans seize cultures par identification morphologique et dans quinze cultures par identification moléculaire, mais le coefficient de corrélation entre les deux méthodes est moyen ( $r = 0,68$ ).

Trois cultures (élevage B, contrôle J14 ; élevage C, IVM J0 ; élevage D, IVM J0) se révèlent positives par identification morphologique et négatives par qPCR, et deux autres (élevage B, IVM J14 et MOX J14) négatives par identification morphologique et positives par qPCR. Par ailleurs, *H. contortus* est identifié comme espèce majoritaire dans quatre cultures de l'élevage A (contrôle J0 et J14, BZ J0, MOX J0) par identification morphologique mais minoritaire par identification moléculaire. Dans les cultures BZ J14 et IVM J0 de l'élevage A,

*H. contortus* est minoritaire selon les deux méthodes mais les proportions sont largement supérieures avec l'identification morphologique. Il semblerait donc que le nombre de L3 de *H. contortus* dans une suspension larvaire soit surestimé lors du comptage par identification morphologique.

Concernant les autres cultures, les proportions de *H. contortus* sont sensiblement identiques entre les deux méthodes. La très faible quantité de L3 de *H. contortus* détectée dans les élevages C et D est en accord avec la biologie de cette espèce : le développement est minime dans les zones géographiques à climat froid et sec, comme les régions de moyenne montagne dont font partie ces deux élevages.

## **4. Discussion**

### 4.1. Efficacité des anthelminthiques dans les quatre élevages étudiés

#### 4.1.1. Mise en évidence de résistances aux benzimidazoles

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité de trois anthelminthiques couramment utilisés dans quatre élevages ovins allaitants de Corrèze. Cependant, le faible nombre d'élevages étudiés ne permet pas d'estimer la prévalence réelle des résistances aux anthelminthiques dans cette région.

Les résultats obtenus suite au FECRT confirment une résistance aux benzimidazoles dans trois élevages sur les quatre testés (A, B et C), bien que les résultats obtenus dans l'élevage C soient à interpréter avec précaution en raison du faible nombre d'animaux par lot (2) retenus pour les calculs. Dans les élevages A et C, l'espèce majoritaire après traitement selon l'identification moléculaire est *T. colubriformis* (respectivement 94% et 85% des L3 ayant survécu), alors que la proportion de cette espèce avant traitement n'excédait pas 51% (respectivement 40 et 51%). *T. colubriformis* est ainsi identifiée comme l'espèce majoritairement résistante dans ces élevages après traitement avec le fenbendazole. Dans l'élevage B, les proportions des espèces ayant survécu au fenbendazole sont plus équilibrées (*H. contortus* : 26%, *T. circumcincta* : 50%, *T. colubriformis* : 24%) avec *T. circumcincta* majoritaire, ce qui est similaire aux résultats obtenus lors des précédentes enquêtes en France (Geurden et al. 2014). De plus, ces proportions relatives sont similaires aux

proportions avant traitement. Les trois espèces étudiées semblent donc présenter le même niveau de résistance aux benzimidazoles dans cet élevage.

Dans l'élevage D, la différence significative d'excrétion fécale entre les groupes contrôle et BZ d'une part, et IVM et MOX d'autre part, s'explique par une conduite d'élevage différente des lots, non-signalée par l'éleveur dans un premier temps. Il est évident que dans ce cas de figure, des coproscopies préliminaires auraient permis de constituer des lots homogènes en regard de l'excrétion fécale d'œufs de SGI. Cela n'a pas été effectué en raison du temps qu'aurait nécessité ces manipulations. Il est donc impossible d'interpréter précisément le FECRT dans cet élevage.

La généralisation des résistances aux BZ chez les petits ruminants est de plus en plus documentée en France (Geurden et al. 2014, Chartier et al. 2001), ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans la présente étude. Le large spectre, le faible coût, la sécurité de traitement et l'autorisation de l'utilisation en lactation de certains BZ jusqu'en 2014 sont impliqués dans l'utilisation massive de ces molécules. De plus, des facteurs de risques ont été identifiés dans les élevages étudiés. Les productions de l'élevage A souffrant plus des infestations par *D. lanceolatum* que des strongyloses gastro-intestinales, le nétohimin est administré fréquemment aux animaux du cheptel en raison de son activité douvicide. Ceci impose une forte pression de sélection « par inadvertance » à la population de nématodes de cet élevage, à l'origine de la résistance observée. Concernant l'élevage B, le cheptel a été largement agrandi par un jeune éleveur reprenant l'exploitation familiale seulement quelques années avant l'étude. L'acquisition d'individus faisant partie à l'origine de divers troupeaux est un facteur de risque bien décrit d'introduction d'allèles de résistance. Dans cet élevage, bien que des mesures de quarantaines aient été mises en place, des traitements par des combinaisons d'anthelminthiques ne semblent pas avoir été effectués, comme il est désormais recommandé. Ceci pourrait être une des raisons du fort niveau de résistance identifié.

#### 4.1.2. Suspicion de résistances aux lactones macrocycliques

Le FECR et l'intervalle de confiance à 95% du lot IVM de l'élevage B permettent l'identification d'un phénomène de résistance à l'ivermectine selon les critères de Coles et al. (1992). Cependant, un seul cas de résistance aux lactones macrocycliques a, jusqu'à



présent, été démontré en élevage ovin allaitant en France (Paraud et al. 2016). Bien que le nombre d'animaux par lot (9) et le niveau moyen d'excrétion des lots contrôles J0 (805 opg) et IVM J0 (794 opg) soient satisfaisants, les résultats du FECRT de ce lot doivent être interprétés avec précaution en regard de la très faible prévalence des résistances à cette famille d'anthelminthiques en France. En effet, il est parfois observé des incohérences entre les résultats de FECRT effectués sur des prélèvements de terrain et de FECRT réalisés sur des prélèvements d'animaux infestés expérimentalement.

Il est donc nécessaire de confirmer la suspicion de résistance émise dans notre étude en effectuant un test de contrôle d'efficacité de l'ivermectine. Ce test nécessite l'infestation expérimentale d'agneaux naïfs avec des L3 de la souche suspecte de résistance, puis la réalisation d'un bilan parasitaire 10 jours après traitement (voir Partie 2, 4.1.2.). Dans cet élevage, l'espèce éventuellement résistante à l'ivermectine serait *T. circumcincta*, majoritaire après traitement (87%) selon l'identification moléculaire mais comptant pour seulement la moitié des L3 avant traitement. Cette observation concorde avec les résultats de l'étude de Paraud dans laquelle l'espèce résistante à l'ivermectine et à la moxidectine était *T. circumcincta* (Paraud et al., 2016).

Si la résistance à l'ivermectine est confirmée chez *T. circumcincta*, des résistances à plusieurs familles d'anthelminthiques auront été mises en évidence dans cet élevage. Ces résistances pourraient être dues à plusieurs sous-populations de *T. circumcincta*, chacune résistante à une seule famille d'anthelminthique, ou à une unique population résistante simultanément à plusieurs familles d'anthelminthiques, soit un cas de multi-résistance. Les lots effectués dans cette étude ne permettent pas de répondre à cette question. L'identification du type de résistance nécessite la réalisation du FECRT sur un lot traité par des benzimidazoles en combinaison avec l'ivermectine. Si les allèles de résistances aux molécules sont portés distinctement par deux sous-populations, le FECR sera théoriquement supérieur à 95%, chaque molécule éliminant la population qui lui est sensible. En revanche, si les allèles de résistance aux deux molécules étudiées sont portés par une seule et même population, le FECR sera théoriquement inférieur à 95%.

Au Royaume-Uni, le seul FECRT permet l'identification de résistances aux lactones macrocycliques en élevage, en raison de la plus grande prévalence des résistances à cette famille de molécule. Il a été observé en Irlande 24% de résistance aux LM sur 1308 élevages étudiés (Keane et al. 2014), et les cas de multi-résistance dans ce pays sont aujourd'hui

préoccupants. La situation est différente en Italie où aucun cas de résistance aux LM n'a encore été découvert. Jusqu'à présent épargnés par ce type de résistance, les élevages français doivent aujourd'hui redoubler de vigilance en raison du premier cas décrit de résistance croisée ivermectine/moxidectine, et de la généralisation des résistances aux benzimidazoles.

#### 4.2. Intérêts et limites des méthodes d'identification morphologique et moléculaire des larves infestantes obtenues par coproculture

La réalisation de coprocultures a pour but de déterminer les espèces impliquées dans l'infestation parasitaire, ainsi que d'identifier les espèces porteuses d'allèles de résistance. En effet, comme il a été vu dans la 1<sup>ère</sup> partie, les proportions relatives de chaque espèce après coproculture sont largement influencées par les conditions d'incubation du prélèvement. Il a été choisi ici une température d'incubation de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , constituant un compromis entre les températures optimales de développement de *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis* (O'Connor, Walkden-Brown, Kahn 2006). Il est tout de même probable que cette température favorise le développement de certaines espèces par rapport à d'autres, donc les proportions relatives des espèces obtenues après identification dans cette étude ne peuvent être considérées comme strictement fidèles aux proportions des espèces lors de l'excrétion des œufs dans les matières fécales (Roeber, Jex, Gasser 2013).

L'identification morphologique des espèces de L3, en plus d'être hautement chronophage, n'est pas aisée et participe également à une mauvaise interprétation des proportions relatives de chaque espèce, même pour un opérateur expérimenté. Notamment, la distinction précise des genres *Teladorsagia* et *Trichostrongylus* selon la méthode de Van Wyk est très difficile voire impossible en raison de la grande ressemblance des L3 de ces espèces (voir annexes 3 et 4). De même, la distinction des genres *Haemonchus* et *Cooperia* nécessite l'observation attentive de l'extrémité crâniale de la larve à la recherche de corps réfringents spécifiques de *Cooperia*, fréquemment responsable d'erreurs d'identification.

Le développement d'outils moléculaires pour la détection des différentes espèces de nématodes permettrait de s'affranchir de la méthode morphologique, peu précise et

fastidieuse. Le gène ribosomal ITS-2 comme cible d'amplification a montré un réel intérêt pour l'identification sensible et spécifique des espèces *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis* (Roeber, Larsen, et al. 2012). Cependant, les amorces et les sondes utilisées doivent être adaptées aux souches étudiées, puisque dans cette étude, des amorces élaborées à partir de souches australiennes de SGI s'hybridaient de manière non-spécifique à l'ADN de souches européennes de *H. contortus*.

Suite à l'élaboration d'amorces LNA, les manipulations se sont révélées répétables (faibles coefficients de variations sur 4 répétitions), sensibles (détection de 7 larves parmi 500) et fortement spécifiques (à l'exception d'un très faible signal obtenu avec des amorces et sondes de *H. contortus* et de l'ADN de *O. venulosum*). Finalement, les courbes standards obtenues révèlent une forte corrélation ( $r = 0,99$ ) entre le Cq de la réaction et le logarithme du nombre de larves dans l'échantillon.

Dans la littérature, plusieurs études rapportent des manipulations qPCR « Multiplex », soit des amorces et sondes complémentaires de différentes espèces dans un même puits de réaction (Roeber, Jex, et al. 2012). Ces manipulations permettent l'économie de temps et d'argent mais n'ont pas été réalisées dans cette étude d'une part afin de réduire le risque d'hybridation non-spécifique, et d'autre part en raison de différentes efficacités des réactions PCR selon l'espèce à amplifier.

L'application de la méthode qPCR sur les suspensions larvaires provenant des élevages étudiés dans cette étude a permis une estimation des espèces impliquées dans les strongyloses et les résistances aux benzimidazoles observées. Concernant le dénombrement des larves, la corrélation avec la méthode morphologique s'est révélée très satisfaisante ( $r = 0,94$ ) à condition que les genres *Cooperia*, *Oesophagostomum* et *Chabertia* soient minoritaires dans le mélange à tester, ce qui était le cas dans les quatre élevages étudiés. Ces espèces ne peuvent être détectées par qPCR à l'heure actuelle, mais interviennent dans le comptage des L3 selon la méthode morphologique. Elles sont cependant fréquemment minoritaires dans le tube digestif des ruminants en France et au Royaume-Uni.

La corrélation des proportions relatives de chaque espèce entre les deux méthodes reste moyenne, notamment pour le genre *H. contortus*. Le faible coefficient de corrélation ( $r = 0,68$ ) est en partie dû au fait que cinq cultures se soient révélées positives selon une méthode et négatives selon la deuxième. Il est à noter que chacune de ces cultures

présentait un très faible nombre de L3 par mL, la différence de volume d'échantillon analysé (80  $\mu$ L de suspension larvaire pour la méthode morphologique et 500  $\mu$ L pour la méthode moléculaire) pourrait ainsi être impliquée dans la discordance observée.

Au vu des résultats obtenus dans cette étude, il semble raisonnable de considérer que la méthode moléculaire offre une analyse plus précise des proportions relatives des espèces présentes dans un échantillon, en plus d'un gain de temps considérable.



## CONCLUSION

La présente étude a permis de dresser le profil des résistances aux anthelminthiques dans quatre élevages ovins allaitants de Corrèze, par la réalisation d'un test de réduction de l'excrétion fécale (FECRT). Deux élevages (A et B) présentent des niveaux de résistance élevés au fenbendazole, pour lesquels des facteurs de risque ont été identifiés. Les niveaux de résistance aux benzimidazoles observés dans cette étude et les espèces impliquées (*T. circumcincta* et *T. colubriformis*) sont compatibles avec les résultats des précédentes études réalisées dans d'autres départements de France. Ceci confirme donc la généralisation des résistances aux benzimidazoles suspectée depuis plusieurs années.

Une suspicion de résistance à l'ivermectine a été émise dans l'élevage B. En raison de la faible prévalence des résistances aux lactones macrocycliques en France à l'heure actuelle (un unique cas décrit en 2016), cette suspicion de terrain doit être confirmée expérimentalement. Si cette résistance est avérée, il serait nécessaire de poursuivre l'enquête dans ce département à la recherche d'autres foyers de résistance aux lactones macrocycliques, qui menaceraient alors la maîtrise des strongyloses gastro-intestinales dans les élevages ovins du centre de la France.

L'identification des espèces impliquées dans les résistances observées a été réalisée de deux manières, par la méthode morphologique conventionnelle et par une méthode moléculaire, la PCR quantitative. Cette méthode s'avère être très bien corrélée à la méthode morphologique pour l'estimation du nombre de L3 par millilitre de suspension larvaire. Le principal avantage de cette méthode, en plus d'un gain de temps significatif, est l'estimation plus précise des proportions relatives des différentes espèces au sein d'un prélèvement. Contrairement à l'identification morphologique, la distinction entre les espèces *T. circumcincta* et *T. colubriformis* est possible, mais seule la détection des L3 de *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis* est actuellement envisageable.

A l'avenir, la méthode d'identification moléculaire par qPCR, associé au FECRT sur des coproscopies de mélange, pourrait permettre la réalisation d'enquêtes de terrain à plus large échelle, avec comme objectif l'établissement de la prévalence réelle des résistances aux anthelminthiques parmi les élevages ovins français.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABBOTT KA, TAYLOR M, STUBBINGS LA (2012). Sustainable Worm Control Strategies For Sheep 4th Edition : A technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers. SCOPS.

ADJOU K (2013). Évaluation de l'état corporel des brebis : grille de notation. *La Semaine Vétérinaire*. N° 1546, 46-47.

AGUILAR-MARCELINO L, MENDOZA-DE-GIVES P, TORRES-HERNÁNDEZ G, LÓPEZ-ARELLANO ME, BECERRIL-PÉREZ, C, ORIHUELA-TRUJILLO A, TORRES-ACOSTA JFJ, OLMEDO-JUÁREZ A, (2016). Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *Journal of Helminthology*, 1-7.

AUMONT G, GRUNER L, HOSTACHE G (2003). Comparison of the resistance to sympatric and allopatric isolates of *Haemonchus contortus* of Black Belly sheep in Guadeloupe (FWI) and of INRA 401 sheep in France. *Veterinary Parasitology*, 139-150.

AUTEF P, (2015). Le Test de Réduction de l'Excrétion Fécale : intérêts et limites. In : *Journées Nationales GTV*, 2015, Nantes.

BARTRAM DJ, LEATHWICK DM, TAYLOR MA, GEURDEN T, MAEDER S (2012). The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. *Veterinary Parasitology*, **186**, 151-158.

BENTOUNSI B, MERADI S, CABARET J (2012). Towards finding effective indicators (diarrhea and anaemia scores and weight gains) for the implementation of targeted selective treatment against the gastro-intestinal nematodes in lambs in a steppic environment. *Veterinary Parasitology*, **187**, 275-279.

BESIER RB (2012). Refugia-based strategies for sustainable worm control: Factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. *Veterinary Parasitology*, **186**, 2-9.

BEUGNET F, POLACK B, DANG H (2004). *Atlas de Coproscopie*. Kalianxis. 280 p. ISBN 2-915758-02-6.

BONNEFONT M, CANELLAS (2014). *Optimisation des outils de diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ovins*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 133 p.

BRARD C, CHARTIER C (1997). Quand suspecter une strongylose digestive chez les ovins et les caprins et conduite à tenir. *Le Point Vétérinaire, numéro spécial « Parasitologie des ruminants »*, **28**, 83-88.

CABARET J, GASNIER N, JACQUIET P (1998). Faecal egg counts are representative of digestive-tract strongyle worm burdens in sheep and goats. *Parasite*, **5**, 137-142.

CABARET J, GONNORD V, CORTET J, SAUVÉ C, BALLEST J, TOURNADRE H et BENOIT M (2006). Indicators for internal parasitic infections in organic flocks: the diarrhea score (Disco)



proposal for lambs. *Organic Farming and European Rural Development*, 552-553.  
<http://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:33651>

CABARET J (2012). Résistance des strongles aux anthelminthiques chez les ruminants. *Le Point Vétérinaire, numéro spécial « Parasitologie interne des ruminants »*, **43**, 8-13.

CARDIA DFF, ROCHA-OLIVEIRA RA, TSUNEMI MH, AMARANTE AFT (2011). Immune response and performance of growing Santa Ines lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections. *Veterinary Parasitology*, **182**, 248-258.

CHARTIER C, CAMUSET P (2012). La gestion du pâturage chez les bovins. *Le Point Vétérinaire, numéro spécial « Parasitologie interne des ruminants »*, **43**, 22-28.

CHARTIER C, PORS I, HUBERT J, ROCHETEAU D, BENOIT C, BERNARD N (1998). Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in western France. *Small Ruminant Research*, **29**, 33-41.

COLES GC, BAUER C, BORGSTEEDE FHM, GEERTS S, KLEI TR, TAYLOR MA, WALLER PJ (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, **44**, 35-44.

COLES GC, JACKSON F, POMROY WE, PRICHARD RK, VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G, SILVESTRE A, TAYLOR MA, VERCRUYSSSE J (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, **136**, 167-185.

COYNE MJ, SMITH G, JOHNSTONE C (1991). Fecundity of gastrointestinal trichostrongylid nematodes of sheep in the field. *American Journal of Veterinary Research*, **52**, 1182-1188.

CRINGOLI G, VENEZIANO V, JACKSON F, VERCRUYSSSE J, GREER AW, FEDELE V, MEZZINO L, RINALDI L (2008). Effects of strategic anthelmintic treatments on the milk production of dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. *Veterinary Parasitology*, **156**, 340-345.

DIKMANS G, ANDREWS (1933). A Comparative Morphological Study of the Infective Larvae of the Common Nematodes Parasitic in the Alimentary Tract of Sheep. *Transactions of the American Microscopical Society*, **52**, 1.

DOBSON RJ, BARNES EH, BIRCLIJIN SD, GILL JH (1992). The survival of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species. *International Journal for Parasitology*, **22**, 1005-1008

EPE C, HOLST C, KOOPMANN R, SCHNIEDER T, LARSEN M, VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G (2009). Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants. *Veterinary Parasitology*, **159**, 86-90.

EPE C, KAMINSKY R (2013). New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends in Parasitology*, **29**, 129-134.

FLEMING SA, CRAIG T, KAPLAN RM, MILLER JE, NAVARRE C, RINGS M (2006). Anthelmintic Resistance of Gastrointestinal Parasites in Small Ruminants. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **20**, 435-444.

FONDRAZ M (2012). *Evaluation de la méthode FAMACHA dans le but de détecter une anémie clinique dans les élevages caprins du Nord-Ouest de l'Argentine*. Thèse de Doctorat vétérinaire, Toulouse, 148 p.

GAILLAC C (2013). *Evaluation de la résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques dans les élevages ovins laitiers en Aveyron*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 126 p.

GASSER RB, CHILTON NB, HOSTE H, BEVERIDGE I (1993). Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Research*, **21**, 2525-2526.

GEORGE SD, GEORGE AJ, STEIN PA, ROLFE PF, HOSKING BC, SEEWALD W (2012). The comparative efficacy of abamectin, monepantel and an abamectin/derquantel combination against fourth-stage larvae of a macrocyclic lactone-resistant *Teladorsagia spp.* isolate infecting sheep. *Veterinary Parasitology*, **188**, 190-193.

GEURDEN T, HODGE A, NOÉ L, WINSTANLEY D, BARTLEY DJ, TAYLOR M, MORGAN C, FRASER SJ, MAEDER S, BARTRAM D (2012). The efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against anthelmintic resistant gastro-intestinal nematodes of sheep in the UK. *Veterinary Parasitology*, **189**, 308-316.

GEURDEN T, HOSTE H, JACQUIET P, TRAVERSA D, SOTIRAKI S, FRANGIPANE DI REGALBONO A, TZANIDAKIS N, KOSTOPOULOU D, GAILLAC C, PRIVAT S, GIANGASPERO A, ZANARDELLO C, NOÉ L, VANIMISSETTI B, BARTRAM D (2014). Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology*, **201**, 59-66.

GUILLERM M (2016). *Evaluation de la résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques dans des élevages d'ovins allaitants de Corrèze*. Rapport de stage DUT génie biologique, Toulouse, 34 p.

HAFSI F, CHINA B, GHALMI F (2012). Le monepantel, un nouvel anthelminthique efficace contre les nématodes gastro-intestinaux des ovins. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **156**, 66-76.

HESSL A, ARBEITHUBER B, TIEMANN-BOEGE I (2017). High-Throughput Genotyping with TaqMan Allelic Discrimination and Allele-Specific Genotyping Assays. In : *Genotyping*. New York, New York : Springer New York, p. 29-57.

HOSTE H, GUITARD JP, PONS JC (2003). Pâturage mixte entre ovins et bovins intérêt dans la gestion des strongyloses gastro intestinales. *Fourrages*, **176**, 425–436.

HOSTE H, HUBY F, MALLET S (1997). Strongylose gastro-intestinales des ruminants : conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. *Le Point Vétérinaire, numéro spécial « Parasitologie des ruminants »*, **28**, 53-59.

- HOSTE H, JACKSON F, ATHANASIADOU S, THAMSBORG SM, HOSKIN O (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, **22**, 253-261.
- JACQUIET P, CANELLAS A, BONNEFONT M, PREVOT F, LIENARD E, MILHES M, GRISEZ C (2014). Les outils de dépistage des strongyloses gastro-intestinales chez les ovins. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, **7**, 247-254.
- JACQUIET P, FIDELLE F, LEPETITCOLLIN E, PRIVAT S, GAILLAC C, BERGEAUD JP, HOSTE H (2014). Etat des lieux de la résistance aux anthelminthiques en France chez les ovins. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, **7**, 29, 240-246.
- JACQUIET P (2015). Comment rationaliser les traitements anthelminthiques en élevage ovin ? *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, **8**, 30.
- JACQUIET P (1997). Les strongles digestifs des ruminants. *Le Point Vétérinaire, numéro spécial « Parasitologie des ruminants »*, **28**, 20-21.
- KAMINSKY R, BAPST B, STEIN P, STREHLAU GA, ALLAN BA, HOSKING BC, ROLFE PF, AGER H (2011). Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitology Research*. **109**, 1, 19-23.
- KAMINSKY R, DUCRAY P, JUNG M, CLOVER R, RUFENER L, BOUVIER J, WEBER S, WENGER A, WIELAND-BERGHAUSEN S, GOEBEL T, GAUVRY N, PAUTRAT F, SKRIPSKY T, FROELICH O, KOMOIN-OKA C, WESTLUND B, SLUDER A, MÄSER P (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, **452**, 176-180.
- KEANE OM, KEEGAN JD, GOOD B, DE WAAL T, FANNING J, GOTTSTEIN M, CASEY M, HURLEY C, SHEEHAN M (2014). High level of treatment failure with commonly used anthelmintics on Irish sheep farms. *Irish veterinary journal*, **67**, 1, 1.
- KERBOEUF D, HUBERT J, HOSTE H (1997). Le diagnostic de laboratoire des strongyloses des ruminants. *Le Point Vétérinaire, numéro spécial « Parasitologie des ruminants »*, **28**, 89-96.
- KÖHLER P (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal For Parasitology*, **31**, 336–345.
- KOTZE AC, O'GRADY J, GOUGH JM, PEARSON R, BAGNALL NH, KEMP DH, AKHURST RJ (2005). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, **35**, 9, 1013-1022.
- KOTZE AC, PRICHARD RK (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. In : *Advances in Parasitology*, Elsevier, p. 397-428.
- LARSEN M (1998). Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*, **29**, 139-146.
- LE JAMBRE LF, DOMINIK S, EADY SJ, HENSHALL JM, COLDITZ IG (2007). Adjusting worm egg counts for faecal moisture in sheep. *Veterinary Parasitology*, **145**, 108-115.

LEFÈVRE PC, BLANCOU J, CHERMETTE R (2003). 105 - Helminthose digestive. In : *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail* - Europe et régions chaudes. TEC & DOC. p. 1330-1331.

LITTLE PR, HODGE A, WATSON TG, SEED JA, MAEDER SJ (2010). Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, **58**, 3, 121-129.

LUO X, SHI X, YUAN C, AI M, GE C, HU M, FENG X, YANG X (2017). Genome-wide SNP analysis using 2b-RAD sequencing identifies the candidate genes putatively associated with resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*, **10**.

MAVROT F, HERTZBERG H, TORGERSON P (2015). Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, **8**, 1.

MCKENNA PB (1985). Diagnosis of gastrointestinal nematode parasitism in goats. In : *Proceedings of a course in Goat Husbandry and Medicine*, 86-95.

MCKENNA PB (1994). Criteria for diagnosing anthelmintic resistance by the faecal egg count reduction test. *New Zealand Veterinary Journal*, **42**, 4, 153-154.

MCKENNA PB (2006). A comparison of faecal egg count reduction test procedures. *New Zealand Veterinary Journal*, **54**, 202-203.

MCNALLY J, CALLAN D, ANDRONICOS N, BOTT N, HUNT PW (2013). DNA-based methodology for the quantification of gastrointestinal nematode eggs in sheep faeces. *Veterinary Parasitology*, **198**, 325-335.

MEDEROS AE, RAMOS Z, BANCHERO GE (2014). First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors*, **7**.

MILHES M, GUILLERM M, ROBIN M, EICHSTADT M, ROY C, GRISEZ C, PREVOT F, LIENARD E, BOUHSIRA E, FRANC M, JACQUIET P (2017). A real-time PCR approach to identify anthelmintic-resistant nematodes in sheep farms. *Parasitology Research*, **116**, 909-290

MORGAN ER, CAVILL L, CURRY GE, WOOD RM, MITCHELL ESE (2005). Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology*, **131**, 79-87.

O'CONNOR LJ, WALKDEN-BROWN SW, KAHN LP (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, **142**, 1-15.

OVEREND DJ, PHILLIPS ML, POULTON AL, FOSTER C (1994). Anthelmintic resistance in Australian sheep nematode populations. *Australian Veterinary Journal*, **71**, 4, 117-121.

PAPADOPOULOS E (2008). Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research*, **76**, 99-103.

PARAUD C, MARCOTTY T, LESPINE A, SUTRA JF, PORS I, DEVOS I (2016). Cross-resistance to moxidectin and ivermectin on a meat sheep farm in France. *Veterinary Parasitology*, **226**, 88-92.

PARAUD C, PORS I, MARCOTTY T, DEVOS I (2014). Un premier cas de résistance aux lactones macrocycliques chez les nématodes gastrointestinaux confirmé en élevage ovin en France. In : *21ème journée des Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*, 2014.

PRICHARD R (1994). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, **54**, 259-268.

PRICHARD R, MÉNEZ C, LESPINE A (2012). Moxidectin and the avermectins: Consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, **2**, 134-153.

RAYNAUD JP (1970). Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de parasitologie humaine et comparée*

ROEBER F, JEX AR, CAMPBELL AJD, CAMPBELL BE, ANDERSON GA, GASSER RB (2011). Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 849-854.

ROEBER F, JEX AR, CAMPBELL AJD, NIELSEN R, ANDERSON GA, STANLEY KK, GASSER, RB (2012). Establishment of a robotic, high-throughput platform for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep. *International Journal for Parasitology*, **42**, 1151-1158.

ROEBER F, JEX AR, GASSER RB (2013a). Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance-an Australian perspective. *Parasites & vectors*, **6**.

ROEBER F, JEX AR, GASSER RB (2013b). Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*, **31**, 1135-1152.

ROEBER F, LARSEN JWA, ANDERSON N, CAMPBELL AJD, ANDERSON GA, GASSER RB, JEX AR (2012). A Molecular Diagnostic Tool to Replace Larval Culture in Conventional Faecal Egg Count Reduction Testing in Sheep. *PLOS ONE*, **7**.

ROOS MH, KWA MSG, VEENSTRA JG, KOOYMAN FNJ, BOERSEMA JH (1993). Molecular aspects of drug resistance in parasitic helminths. *Pharmacology & therapeutics*, **60**, 331-336.

ROSE H, RINALDI L, BOSCO A, MAVROT F, DE WAAL T, SKUCE P, CHARLIER J, TORGERSON PR, HERTZBERG H, HENDRICKX G, VERCRUYSE J, MORGAN ER (2015). Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Veterinary Record*, **176**, 546-546.

SALES N, LOVE S (2016). Resistance of *Haemonchus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel / abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. *Veterinary Parasitology*, **228**, 193-196.

SAUMELL CA, FERNÁNDEZ AS, ECHEVARRIA F, GONÇALVES I, IGLESIAS L, SAGÜES MF, RODRÍGUEZ EM (2016). Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. *Journal of Helminthology*, **90**, 706-711.

SCHILLHORN VAN VEEN TW (1988). Evaluation of abomasal enzyme and hormone levels in the diagnosis of ostertagiasis. *Veterinary parasitology*, **27**, 139–149.

SHAW DJ, DOBSON AP (1995). Patterns of macroparasite abundance and aggregation in wildlife populations: a quantitative review. *Parasitology*, **111**, 111-127.

SINOTT MC, CUNHA FILHO NA, CASTRO LLD, LORENZON LB, PINTO NB, CAPELLA GA, LEITE FPL (2012). *Bacillus spp.* toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. *Experimental Parasitology*, **132**, 103-108.

STEAR MJ, WAKELIN D (1998). Genetic resistance to parasitic infection. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, **17**, 143-153.

TABEL J (2011). *Alternatives au traitement chimiothérapeutiques des strongyloses gastro-intestinales des ovins: bilan et perspectives*. Thèse de Doctorat vétérinaire, Toulouse, 229 p.

TAYLOR MA, HUNT KR, GOODYEAR KL (2002). Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, **103**, 183–194.

TAYLOR M (2013). Anthelmintic Resistance and Worm Control in Sheep. In: *Teagasc National Sheep Conference*, 2013.

TORRES-ACOSTA JFJ, HOSTE H (2008). Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, **77**, 159-173.

VAN WYK JA, BATH G (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*, **33**, 509-529.

VAN WYK JA, HOSTE H, KAPLAN RM, BESIERS RB (2006). Targeted selective treatment for worm management—How do we sell rational programs to farmers? *Veterinary Parasitology*, **139**, 336-346.

VAN WYK JA, MAYHEW E (2013). Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **80**.

VAN WYK JA (1990). Integrated worm control as a strategy in the control of gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. *Journal of the South African Veterinary Association*, **61**, 141–145.

VANDAËL E (2010). Le monépanтел : chef de file d'une nouvelle classe de nématocides. *Le Point Vétérinaire*, **307**, 20-21.

VEILLET F (2001). *Le closantel: synthèse bibliographique*. Thèse de Doctorat vétérinaire, Toulouse, 105 p.

VLASSOFF A, MCKENNA PB (1994). Nematode parasites of economic importance in sheep in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, **21**, 1-8.

WAGHORN T, LEATHWICK D, RHODES A, LAWRENCE K, JACKSON R, POMROY W, WEST D, MOFFAT J (2006). Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, **54**, 271-277.

WALLER PJ (1999). International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, **29**, 155-164.

WALLER PJ (2006). Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology*, **126**, 277-289.

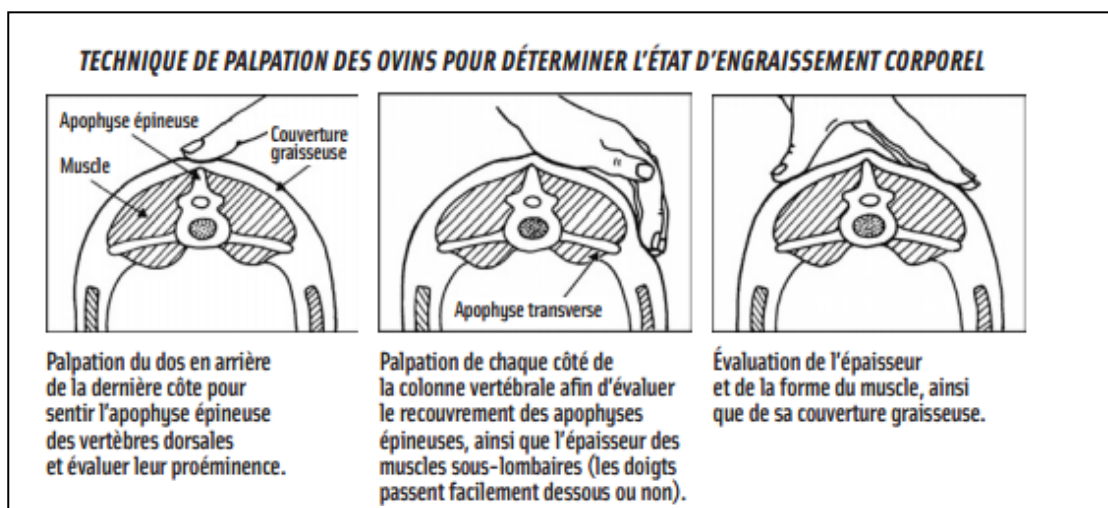
WEI JZ, HALE K, CARTA L, PLATZER E, WONG C, FANG SC, AROIAN R (2003). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 2760–2765.

WOLSTENHOLME AJ, FAIRWEATHER I, PRICHARD R, VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G, SANGSTER NC (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, **20**, 469-476.

ZAJAC AM (2006). Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, **22**, 529-541.

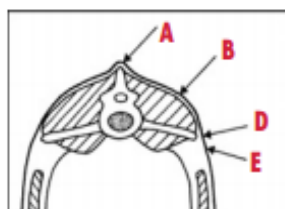
## ANNEXES

Annexe 1: Evaluation de la NEC des ovins : grille de notation (d'après Adjou, 2013)



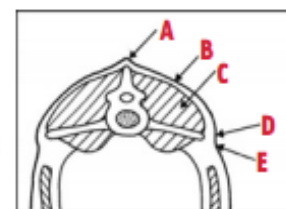
**NOTE 1 = brebis très maigre ou émaciée**

- A > Épine pointue et proéminente
- B > Pas de graisse de couverture
- D > Processus transverses pointus
- E > Les doigts passent facilement dessous et palpent chacun d'eux



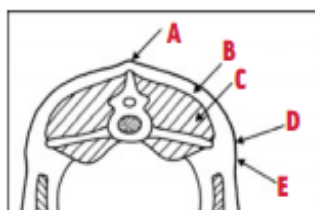
**NOTE 2 = brebis assez maigre**

- A > Épine proéminente, mais moins saillante
- B > Fine couverture de graisse
- C > Développement modéré des muscles
- D > Processus transverses arrondis
- E > Une pression est nécessaire pour passer les doigts dessous



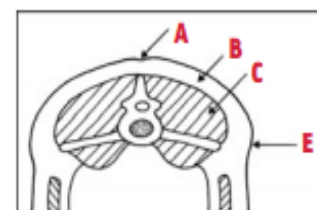
**NOTE 3 = brebis en état**

- A > Épine arrondie
- B > Couverture graisseuse modérée
- C > Muscles pleins
- D > Processus transverses arrondis
- E > Une forte pression des doigts est nécessaire pour localiser les pointes osseuses



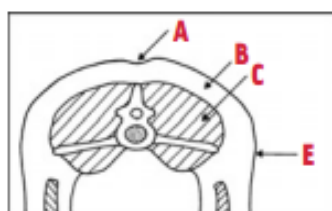
**NOTE 4 = brebis grasse**

- A > Épine dorsale réduite à une ligne
- B > Épaisse couverture graisseuse
- C > Muscles pleins
- E > Impossible de sentir les processus transverses



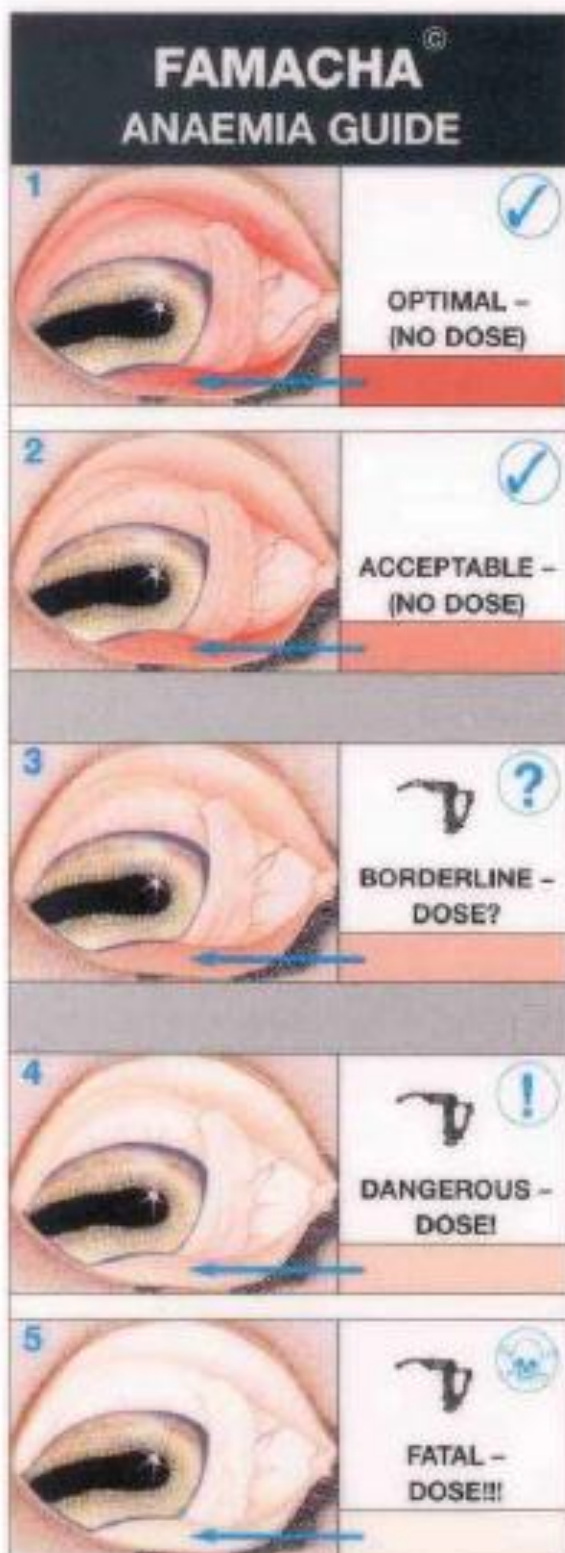
**NOTE 5 = brebis obèse**

- A > Colonne vertébrale indétectable
- B > Couverture graisseuse dense
- C > Muscles très pleins
- E > Processus transverses indétectables

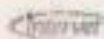




Annexe 2 : Nuancier utilisé et instructions dans le cadre de la méthode FAMACHA (d'après Fondraz 2012)



DEVELOPED AND SUPPORTED BY:



**INSTRUCTIONS FOR USE**

**Examination**

- Examine sheep in good, natural light
- Open the eyelid as shown in the sketch
- Push the upper eyelid down with the upper thumb, while the lower thumb gently pulls the lower lid downward
- Look especially at the colour inside the lower eyelid
- Open the eyelid for a short time only, or else the mucous membrane may become redder
- Compare the colours seen to those on the reverse side of this card
- Score the sheep 1 to 5 and proceed as explained in the pamphlet
- If in doubt, score the sheep at the lower (paler) category
- Examine weekly and no less than every 2 to 3 weeks
- Contact your veterinarian if you have any questions

Look inside bottom eyelid



**Precautions**

- Only properly trained persons should use this card
- Read the full information pamphlet before using the guide and follow instructions carefully
- This guide is intended for sheep only
- If used for goats, all those in category 3 should also be treated
- This card is an aid in the control of wireworm only
- Paleness or reddening of the eyes may have other causes
- Maintain standard worm control measures
- The colours of this card will fade with time, especially if exposed to the sun
- Replace the card after 12 months use
- As the system is used in conditions outside their control, no organisation involved in its development or distribution accepts liability for losses or problems associated with its use

**COPYRIGHT**

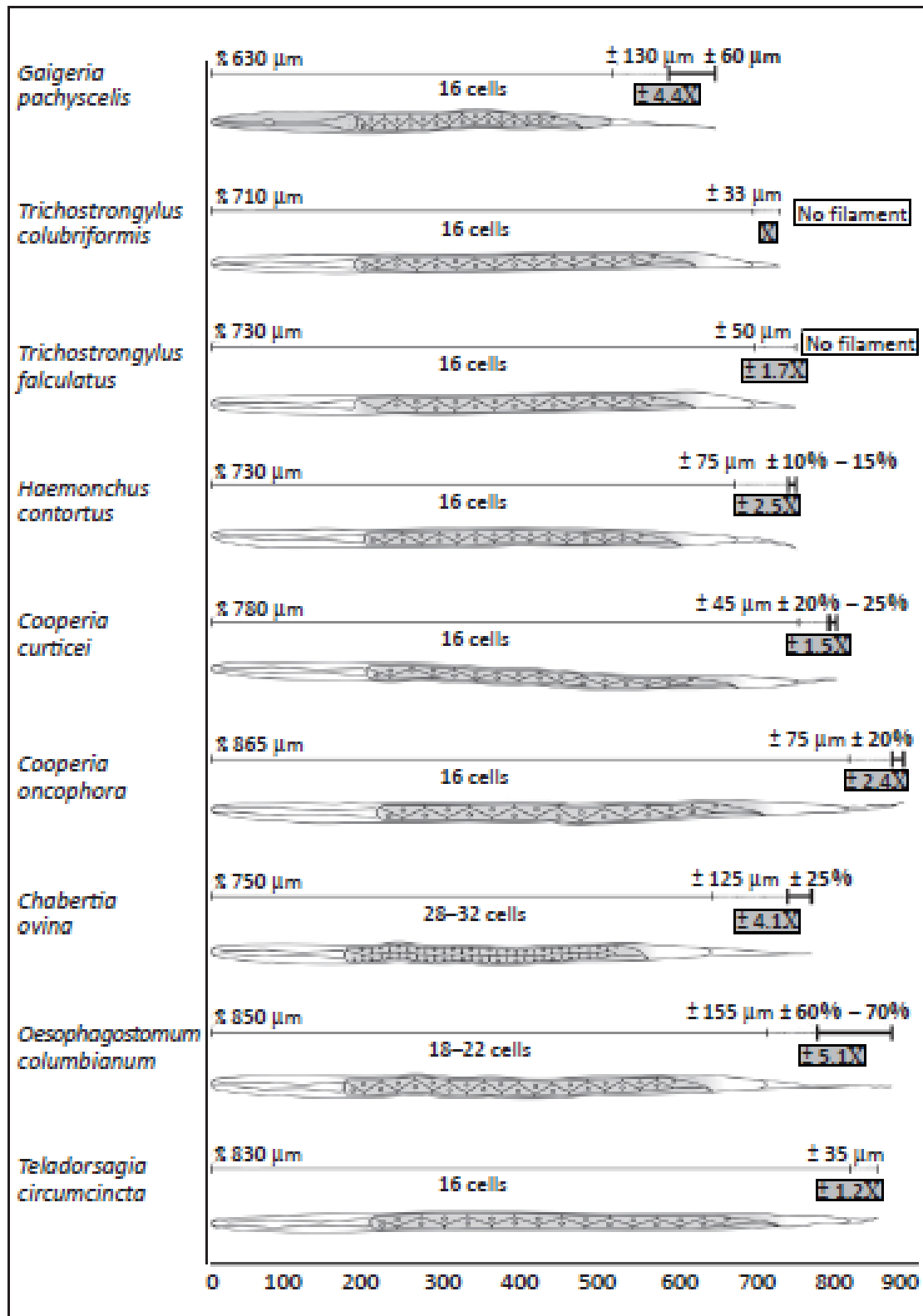
This system and card is owned by the Livestock Health and Production Group of the South African Veterinary Association and is subject to copyright rules. No reproduction or modification is permitted without written authorisation

**Enquiries:**

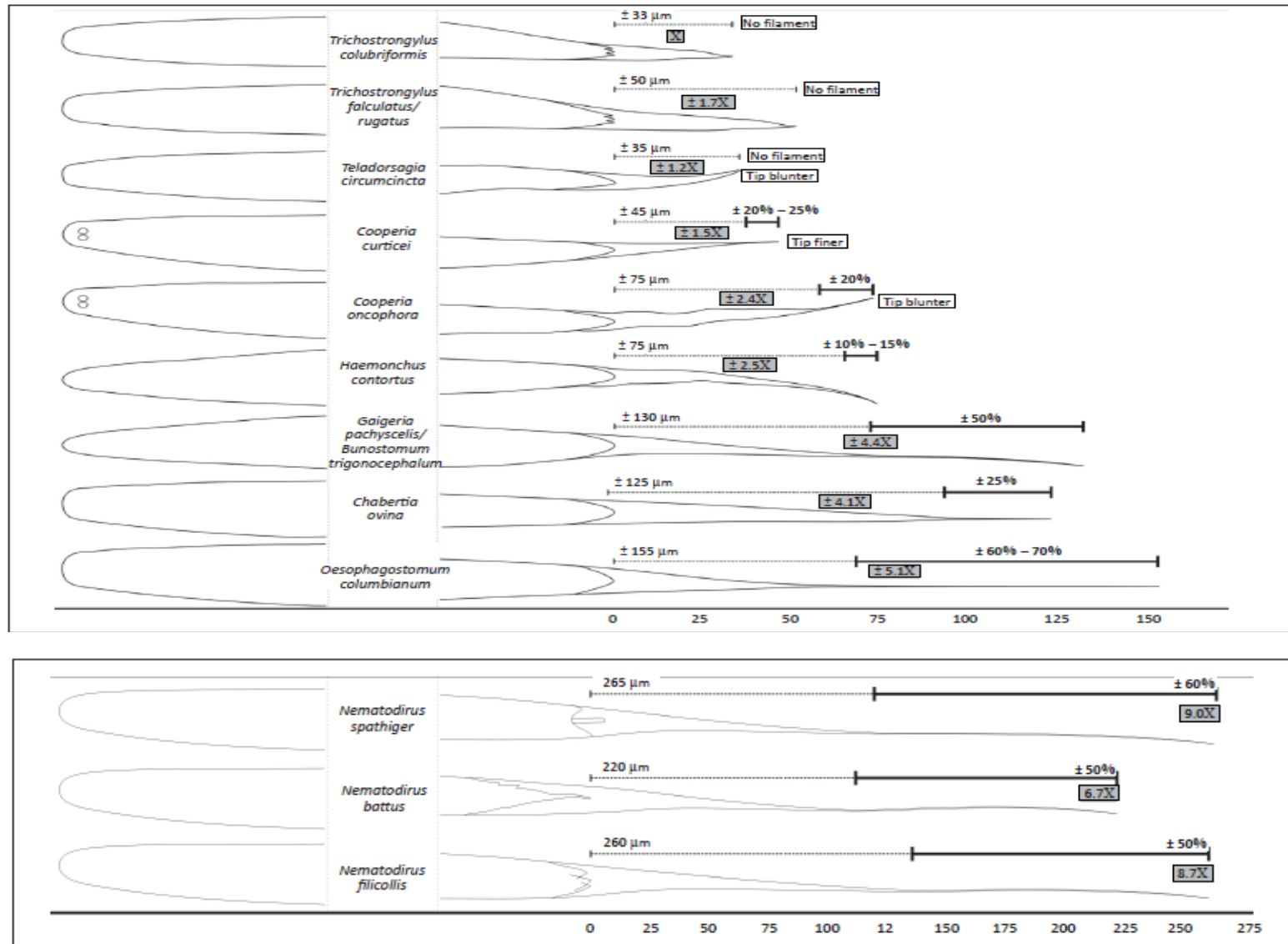
Prof. G F Bath

phone: + 27 12 529-8038  
 fax: + 27 12 529-8396  
 email: gfbath@op.up.ac.za

Annexe 3 : Morphologie et taille des larves L3 des principales espèces de nématodes des ovins (d'après Van Wyk, Mayhew 2013)



Annexe 4 : Extrémités craniales et caudales des larves L3 des principales espèces de nématodes des ovins (d'après Van Wvk. Mavhew 2013)



Annexe 5 : Calcul de l'intervalle de confiance à 95%

**Moyenne arithmétique des FEC :**

$$\overline{FEC} = \sum_j FEC_j / n$$

**Variance d'un lot :**

$$S^2 = \frac{\sum_j FEC_j^2 - \frac{(\sum_j FEC_j)^2}{n}}{n-1}$$

**Variance de réduction :**

$$Y^2 = \frac{S_t^2}{n_t \overline{FEC}_t^2} + \frac{S_c^2}{n_c \overline{FEC}_c^2}$$

Où  $t$  fait référence au lot testé post-traitement et  $c$  fait référence au lot testé pré-traitement ou au lot contrôle post-traitement

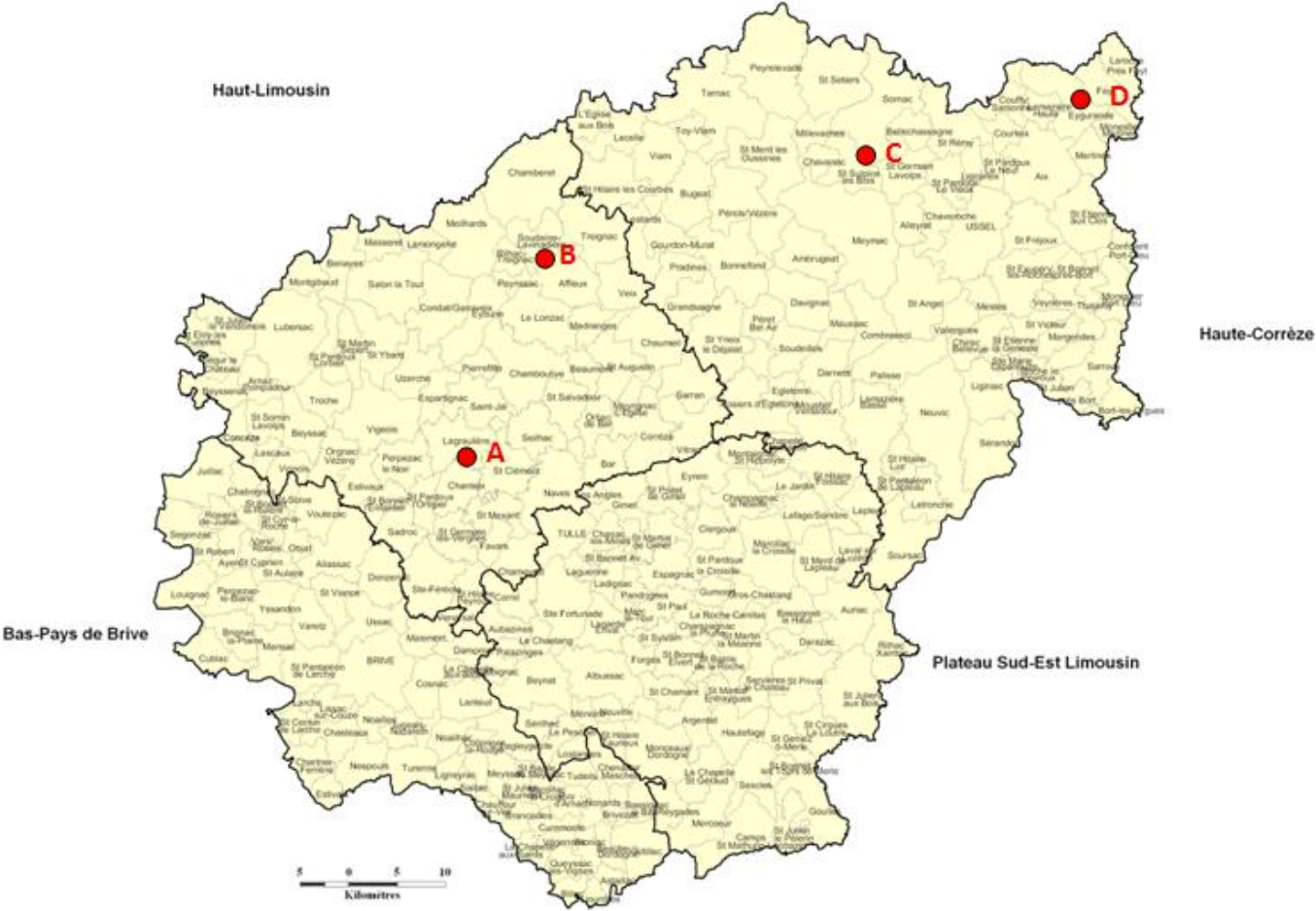
**Borne inférieure de l'IC 95% :**

$$100 \left[ 1 - \frac{\overline{FEC}_t}{\overline{FEC}_c} e^{(2,048 * \sqrt{Y^2})} \right]$$

**Borne supérieure de l'IC 95% :**

$$100 \left[ 1 - \frac{\overline{FEC}_t}{\overline{FEC}_c} e^{(-2,048 * \sqrt{Y^2})} \right]$$

Annexe 6 : Situations géographiques en Corrèze des élevages participants à l'étude



Annexe 7 : Comparaison de la spécificité des amorces *Forward* LNA et de McNally sur des souches européennes de *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*.

Echantillon	Amorce <i>Forward</i>	Sonde		
		<i>H. contortus</i>	<i>T. circumcincta</i>	<i>T. colubriformis</i>
<b><i>H. contortus</i></b> (Humeau, France)	<i>H. contortus</i> (McNally)	16,6	-	-
	<i>H. contortus</i> (LNA)	18,6	-	-
	<i>T. circumcincta</i> (McNally)	36	-	-
	<i>T. circumcincta</i> (LNA)	-	-	-
	<i>T. colubriformis</i> (McNally)	26	-	-
	<i>T. colubriformis</i> (LNA)	-	-	-
<b><i>T. circumcincta</i></b> (Le Merle, France)	<i>H. contortus</i> (McNally)	-	-	-
	<i>H. contortus</i> (LNA)	-	-	-
	<i>T. circumcincta</i> (McNally)	-	19,8	-
	<i>T. circumcincta</i> (LNA)	-	17,7	-
	<i>T. colubriformis</i> (McNally)	-	-	-
	<i>T. colubriformis</i> (LNA)	-	-	-
<b><i>T. colubriformis</i></b> (Weybridge, UK)	<i>H. contortus</i> (McNally)	-	-	-
	<i>H. contortus</i> (LNA)	-	-	-
	<i>T. circumcincta</i> (McNally)	-	-	-
	<i>T. circumcincta</i> (LNA)	-	-	-
	<i>T. colubriformis</i> (McNally)	-	-	21,5
	<i>T. colubriformis</i> (LNA)	-	-	16,8

Les valeurs correspondent au Cq de la réaction PCR. Les Cq colorés en rouge correspondent à une hybridation non-spécifique.

Annexe 8 : Amorces et sondes PCR utilisées

	Référence	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
Amorce Forward	McNally et al. (2013)	TCAAGAACATATACATGCA (Tm = 62,9°C)	GTTCAAGAATAACATATGC (Tm = 62,9°C)	YAGTTYAAGAAYAATAYA (Tm = 60,9°C)
	LNA Forward Primer	CA +TATACATGCAAC +G (Tm = 54°C)	+CAGTT +CAAGAATAA +C (Tm = 51°C)	AATGGT +CATTRTCAA +A (Tm = 53°C)
Sonde	McNally et al. (2013)	TGACATGTATGGCGACGAT	CCGTCGTAACGTTCTGAAT	CCTGTATGATGTGAACGTGT
Amorce Reverse NC2	Gasser et al. (1993)	TTAGTTTCTTTCTCCGCT (Tm = 54°C)		

+N : Locked Nucleic Acid

Annexe 9 : Vérification de la spécificité des réactions PCR sur des vers adultes provenant du tube digestif d'agnelles à l'abattoir

Espèce	Elevage	Nombre et sexe des adultes	Amorces et sondes spécifiques		
			<i>H. contortus</i>	<i>T. circumcincta</i>	<i>T. colubriformis</i>
<i>H. contortus</i>	1	2 femelles	19,22	-	-
	2	4 mâles	19,3	-	-
<i>T. circumcincta</i>	1	1 femelle	-	28,17	-
	2	1 mâle	-	24,5	-
<i>T. colubriformis</i>	1	3 femelles, 3 mâles	-	-	21,61
<i>C. curticei</i>	1	2 femelles, 2 mâles	-	-	-
	2	2 femelles, 5 mâles	-	-	-
<i>Nematodirus sp.</i>	1	5 femelles, 5 mâles	-	-	-
	2	1 mâle	-	-	-
<i>O. venulosum</i>	2	1 femelle	36,3	-	-

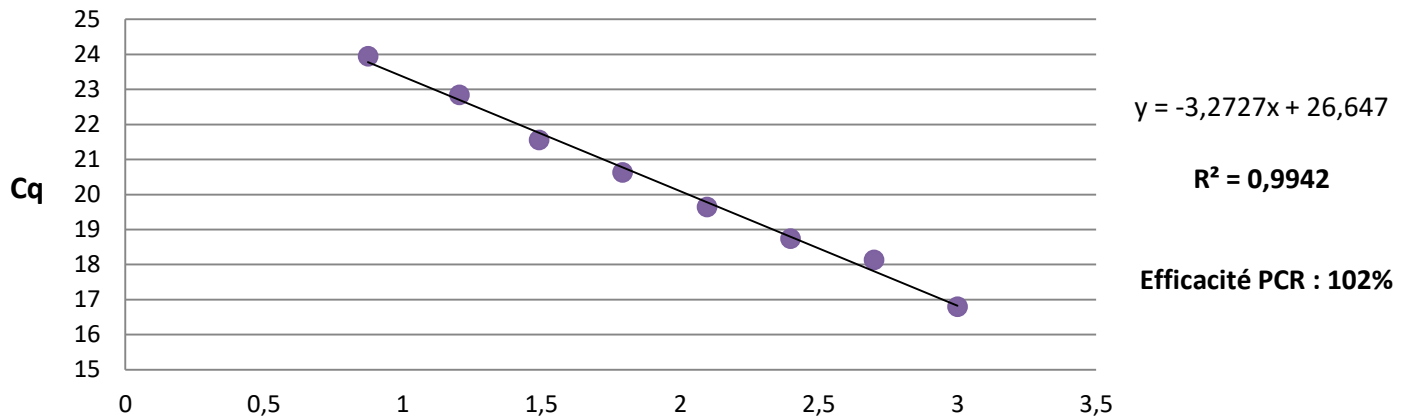
Les Cq colorés en rouge correspondent à une hybridation non-spécifique.

Annexe 10 : Test de répétabilité des manipulations PCR

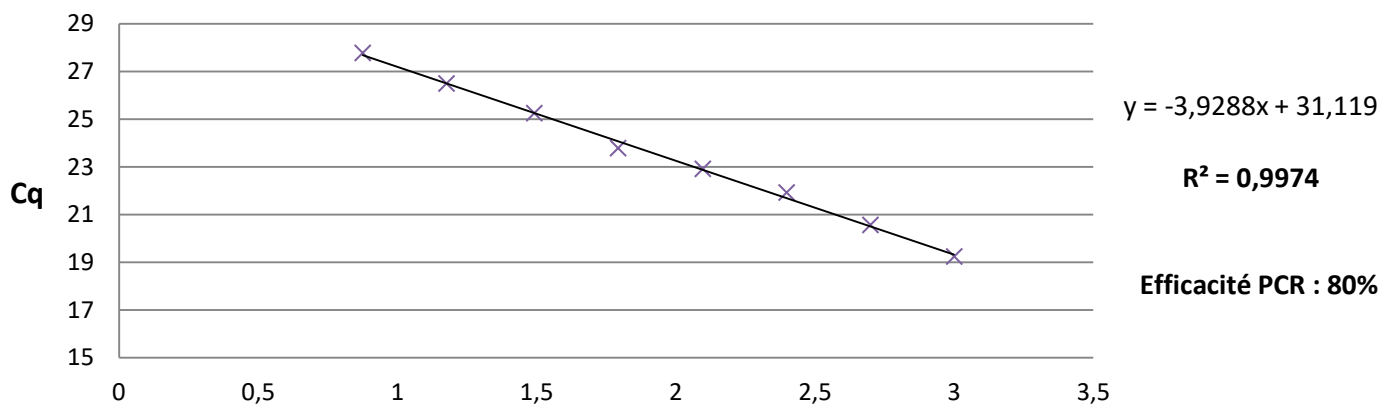
Espèce	Quantité d'ADN équivalente à : (L3)	Cq : Moyenne ± écart-type (4 répétitions)	Coefficient de variation (%)
<i>Haemonchus contortus</i>	500	17,33 ± 0,76	4,4
	62	20,74 ± 0,33	1,6
	7	25,8 ± 0,46	1,8
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	500	19,41 ± 0,36	1,9
	62	24,06 ± 0,5	2,1
	7	27,56 ± 0,37	1,3
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	500	19,12 ± 0,32	1,7
	62	21,73 ± 0,34	1,6
	7	24,8 ± 0,44	1,8



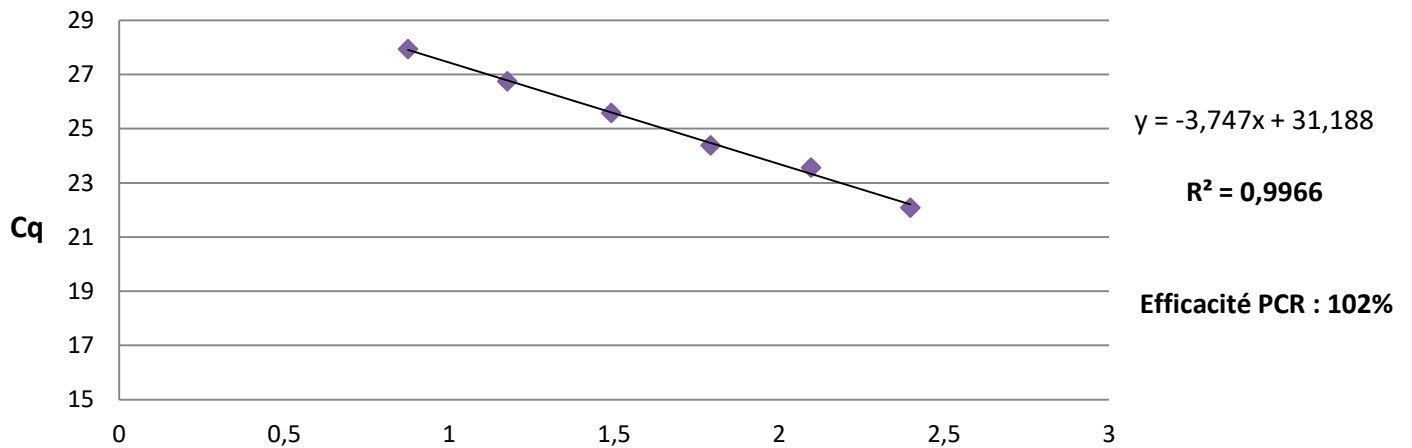
Annexe 11 : Courbes standards PCR des 3 espèces étudiées



Logarithme du nombre de larves d'*Haemonchus contortus* équivalent à la quantité d'ADN dans le puits



Logarithme du nombre de larves de *Trichostrongylus colubriformis* équivalent à la quantité d'ADN dans le puits



Logarithme du nombre de larves de *Teladorsagia circumcincta* équivalent à la quantité d'ADN dans le puits



Annexe 12 : Détail des coproscopies individuelles et du calcul des intervalles de confiance de l'élevage A.

Lot Contrôle (n=7)			Lot Panacur® (n=7)			Lot Oramec® (n=7)			Lot Cydectine® (n=7)		
numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14
50633	1000	600	50494	850	350	51204	200	0	<del>41526</del>	<del>0</del>	<del>0</del>
50516	600	300	51194	1200	700	<del>51121</del>	<del>100</del>	<del>50</del>	<del>50636</del>	<del>50</del>	<del>0</del>
41507	400	350	51174	1600	200	51162	400	0	51129	4550	0
51176	450	300	<del>41538</del>	<del>0</del>	<del>50</del>	<del>50489</del>	<del>100</del>	<del>100</del>	51184	400	15
51224	500	300	51150	150	250	50427	150	15	41544	250	0
<del>51149</del>	<del>50</del>	<del>200</del>	51219	650	200	41500	250	0	51090	250	0
51240	450	800	<del>51162</del>	<del>0</del>	<del>100</del>	51208	1150	0	41542	350	30
<del>51207</del>	<del>15</del>	<del>0</del>	51129	2050	850	<del>51201</del>	<del>50</del>	<del>0</del>	51136	500	0
51140	650	600	<del>50505</del>	<del>50</del>	<del>15</del>	51154	500	0	52594	750	15
<del>51093</del>	<del>0</del>	<del>0</del>	51203	750	300	51177	350	0	<del>50257</del>	<del>15</del>	<del>0</del>
<b>moyenne</b>	<b>578,6</b>	<b>464,3</b>	<b>moyenne</b>	<b>1035,7</b>	<b>407,1</b>	<b>moyenne</b>	<b>428,6</b>	<b>1,9</b>	<b>moyenne</b>	<b>1007,1</b>	<b>9,0</b>
<b>FECR (%)</b>	<b>-</b>		<b>12,3</b>			<b>99,6</b>			<b>98</b>		
Variance	40595,2		67857,1			32,1			139,3		
Variance de la réduction			0,09			1,33			0,27		
IC 95%			[-59,5 ; 51,8]			[95,7 ; 99,9]			[94,4 ; 99,9]		

Annexe 13 : Détail des coproscopies individuelles et du calcul des intervalles de confiance de l'élevage B.

Lot Contrôle (n=9)			Lot Panacur® (n=9)			Lot Oramec® (n=9)			Lot Cydectine® (n=9)		
numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14
30394	150	300	31063	1650	800	30207	600	100	30411	350	0
30571	800	400	30446	800	400	30486	550	45	30221	200	0
<del>30564</del>	<del>700</del>	<del>0</del>	30224	600	550	30310	250	100	30392	450	0
30400	2550	2450	41108	500	1000	<del>30126</del>	<del>0</del>	<del>0</del>	<del>30511</del>	<del>50</del>	<del>0</del>
31712	250	1000	<del>31025</del>	<del>100</del>	<del>450</del>	31188	1800	200	30219	300	0
31130	1300	1050	31217	1950	250	30534	1250	300	30423	1700	0
30278	1350	600	30415	900	1100	30422	500	200	30246	1350	50
30506	250	450	41044	3450	2350	30239	300	50	30559	900	0
31118	300	400	31119	500	450	30293	650	100	30452	300	100
31026	300	500	31210	700	700	41240	1250	50	30427	150	0
<b>moyenne</b>	<b>805,6</b>	<b>749,4</b>	<b>moyenne</b>	<b>1227,8</b>	<b>844,4</b>	<b>moyenne</b>	<b>794,4</b>	<b>127,2</b>	<b>moyenne</b>	<b>633,3</b>	<b>16,7</b>
<b>FECR (%)</b>	<b>-</b>		<b>- 6,3</b>			<b>84</b>			<b>97,9</b>		
Variance	455902,8		396527,8			7669,4			1250		
Variance de la réduction			0,14			0,13			0,58		
IC 95%			[-130 ; 50,9]			[66,2 ; 92,4]			[90,0 ; 99,6]		

Annexe 14 : Détail des coproscopies individuelles et du calcul des intervalles de confiance de l'élevage C.

Lot Contrôle (n=2)			Lot Panacur® (n=2)			Lot Oramec® (n=1)			Lot Cydectine® (n=2)		
numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14
51076	250	150	51139	0	0	51123	0	0	51139	0	0
51121	450	750	51130	0	0	51001	50	0	51107	100	0
41366	0	50	51185	0	0	51020	0	0	51025	100	0
51169	0	0	51205	300	100	51003	0	0	51079	0	0
51269	0	350	51152	0	0	51143	0	0	51027	100	0
51132	0	50	51098	0	0	51048	50	0	51126	15	0
41350	0	15	41360	0	0	51083	50	0	51030	450	0
41384	0	0	51067	150	50	51231	150	0	51051	400	0
51031	0	200	41343	50	50	51117	0	0	41349	100	0
51105	50	250	51044	0	0	41396	0	0	41381	100	0
<b>moyenne</b>	<b>350</b>	<b>450</b>	<b>moyenne</b>	<b>225</b>	<b>75</b>	<b>moyenne</b>	<b>150</b>	<b>0</b>	<b>moyenne</b>	<b>425</b>	<b>0</b>
<b>FECR (%)</b>	<b>-</b>		<b>83,3</b>			<b>100</b>			<b>100</b>		
Variance	180000		1250			0			0		
Variance de la réduction			0,56			-			-		
IC 95%			<b>[23,3 ; 96,4]</b>			-			-		

Annexe 15 : Détail des coproscopies individuelles et du calcul des intervalles de confiance de l'élevage D.

Lot Contrôle (n=1)			Lot Panacur® (n=2)			Lot Oramec® (n=7)			Lot Cydectine® (n=6)		
numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14	numéro	FEC J0	FEC J14
51226	100	100	51233	50	0	51222	2550	0	51026	350	0
51230	100	100	51235	200	0	51223	1250	0	51023	400	0
51323	0	0	51031	0	0	51021	500	0	51025	1200	0
51234	150	100	51033	50	0	51224	600	0	51024	1200	0
51227	0	100	51030	200	0	51221	550	0	51028	1100	0
51228	50	50	51032	100	0	51029	1350	0	51041	0	0
51229	0	0	51027	100	50	51022	1400	0	51042	300	0
<b>moyenne</b>	<b>150</b>	<b>100</b>	<b>moyenne</b>	<b>200</b>	<b>0</b>	<b>moyenne</b>	<b>1171,4</b>	<b>0</b>	<b>moyenne</b>	<b>758,3</b>	<b>0</b>
<b>FECR (%)</b>	<b>-</b>		<b>100</b>			<b>100</b>			<b>100</b>		
Variance	<b>-</b>		<b>0</b>			<b>0</b>			<b>0</b>		
Variance de la réduction			<b>-</b>			<b>-</b>			<b>-</b>		
IC 95%			<b>-</b>			<b>-</b>			<b>-</b>		



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussigné, Philippe JACQUIET, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **EICHSTADT Maxime** intitulée « **Evaluation de la résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques dans quatre élevages ovins allaitants de Corrèze** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

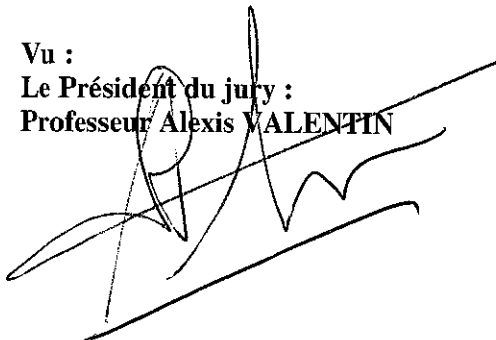
Fait à Toulouse, le 2 mai 2017  
Professeur Philippe JACQUIET  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Alexis VALENTIN



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT

M. EICHSTADT Maxime  
a été admis(e) sur concours en : 2011  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 03/11/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.







TOULOUSE, 2017

NOM : EICHSTADT

PRENOM : MAXIME

**TITRE : EVALUATION DE LA RESISTANCE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX AUX ANTHELMINTHIQUES DANS QUATRE ELEVAGES OVINS ALLAITANTS DE CORREZE**

RESUME : Il a été évalué la résistance des strongles gastro-intestinaux au fenbendazole, à l'ivermectine et à la moxidectine dans quatre élevages ovins allaitants de Corrèze, à l'aide du test de réduction de l'excrétion fécale (FECRT). Dans trois élevages sur quatre, des résistances au fenbendazole ont été identifiées, et dans un de ces trois élevages, une résistance à l'ivermectine a également été mise en évidence. Pour chaque lot, des larves ont été obtenues par coproculture avant et après traitement. Les proportions relatives de chaque espèce de larves ont été déterminées selon une méthode d'identification morphologique et une méthode moléculaire (qPCR). Selon l'identification par qPCR, *T. colubriformis* est l'espèce majoritairement responsable des résistances au fenbendazole dans deux élevages. Dans l'élevage où des résistances au fenbendazole et à l'ivermectine sont identifiées, des niveaux semblables de résistance au fenbendazole sont observés pour *H. contortus*, *T. colubriformis* et *T. circumcincta*. En revanche, seule *T. circumcincta* semble impliquée dans la résistance à l'ivermectine identifiée. La méthode d'identification moléculaire apparaît prometteuse pour l'évaluation à grande échelle des résistances en élevage ovin.

MOTS-CLES : STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX, NEMATODES, OVINS, TRAITEMENT, ANTHELMINTHIQUE, RESISTANCE, FENBENDAZOLE, IVERMECTINE, MOXIDECTINE, IDENTIFICATION, MORPHOLOGIQUE, MOLECULAIRE, PCR, CORREZE

---

**TITLE : EVALUATION OF THE ANTHELMINTHIC RESISTANCE OF GASTROINTESTINAL NEMATODES IN FOUR MEAT SHEEP FARMS IN THE DEPARTEMENT OF CORREZE**

ABSTRACT : Resistance to fenbendazole, ivermectin and moxidectin was explored by a Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT) in four meat sheep flock in the Corrèze *département* (southwestern France). Resistance to fenbendazole was found in three of four farms, and resistance to ivermectin in one of them. For each studied group, larval cultures were performed before and after treatment, and relative proportions of species were determined by both morphological and molecular (qPCR) identification methods. According to the molecular method, *T. Colubriformis* was identified as the major resistant specie to fenbendazole in two farms. Concerning the farm in which resistance to both fenbendazole and ivermectin was found, *H. contortus*, *T. colubriformis* and *T. Circumcincta* showed equal levels of fenbendazole resistance, but only *T. Circumcincta* was involved in the ivermectin resistance. Molecular identification method (qPCR) seems to be helpful for massive identification of anthelmintic resistance in sheep industry.

KEY WORDS : GASTROINTESTINAL NEMATODES, STRONGYLID, SHEEP, TREATMENT, ANTHELMINTHIC, RESISTANCE, FENBENDAZOLE, IVERMECTINE, MOXIDECTINE, IDENTIFICATION, MORPHOLOGICAL, MOLECULAR, PCR, CORREZE