

ANNEE 2021 THESE : 2021 – TOU 3 – 4014

DYNAMIQUE DES RESISTANCES AUX ANTHELMINTHIQUES CHEZ LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX DANS DEUX ESTIVES OVINES PYRENEENNES

THESE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

COLLIGNON Marie-Pierre

Née le 29/08/1995 à VILLENEUVE-SUR-LOT (47)

et

COLLIOT François

Né le 11/03/1996 à PARIS (75)

Directeur de thèse : M. Philippe JACQUIET

JURY

PRESIDENT :

M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

M. Philippe JACQUIET

M. Xavier NOUVEL

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRES INVITES :

M. Thierry CAZAJOUS

Docteur Vétérinaire, praticien à Mirepeix (64)

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie – Thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PETIT Claude**, (Emérite) - *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

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 **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
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. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie, production animale*,
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
Mme **SOUVESTRE Marie**, *Production et pathologie aviaire*
Mme **TOUSSAIN Marion**, *Pathologie des équidés*

ENSEIGNANT DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES VETERINAIRES

Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M **BESSIERE Pierre**, *Microbiologie infectiologie*
Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

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 notre jury de thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de 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 de diriger cette thèse en nous confiant ce travail.

Pour votre grande disponibilité, vos conseils et votre investissement dans ce projet.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde gratitude et de nos respects les plus sincères.

A Monsieur le Docteur Xavier NOUVEL

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie de la reproduction

Qui a aimablement accepté de prendre part à notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Thierry CAZAJOUS

Docteur vétérinaire à Mirepeix (64)

Qui a grandement contribué à la réalisation de ce projet, en nous apportant une grande aide auprès des éleveurs.

Pour votre disponibilité, vos conseils, le temps consacré et surtout votre gentillesse.

Profonde gratitude.

A Madame Françoise PREVOT

Ingénieure de recherche

Laboratoire de parasitologie – Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pour votre précieuse contribution à la réalisation des manipulations.

Sincères remerciements.

A Madame Léa BORDES

Doctorante Universitaire en parasitologie ovine

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – Institut National de la Recherche Agronomique

Pour ton aide lors de la réalisation des coproscopies et coprocultures.

Sincères remerciements.

Table des matières

TABLE DES FIGURES

TABLES DES TABLEAUX

TABLE DES ANNEXES

INTRODUCTION

PARTIE 1 : BIOLOGIE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX ET MAITRISE DES STRONGYLOSES INDUITES CHEZ LES OVINS

Introduction	21
1. Classification et biologie des strongles gastro-intestinaux des ovins	25
1.1 Classification	25
1.2 Cycle de développement commun aux strongles gastro-intestinaux.....	28
1.2.1 <i>La phase parasitaire</i>	28
1.2.2 <i>La phase libre</i>	29
1.3 Biologie des espèces majeures.....	29
1.3.1 <i>Haemonchus contortus</i>	29
1.3.2 <i>Teladorsagia circumcincta</i>	30
1.3.3 <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	30
1.4 Signes cliniques et lésions suite à une infestation	31
2. Epidémiologie et modalités d'infestations.....	32
2.1 Répartition géographique et temporelle des différents parasites	32
2.2 Facteurs de réceptivité et sensibilité chez les ovins.....	33
2.3 Source de transmission, d'infestation et causes favorisantes	33
2.4 Chronologie de l'infestation.....	34
3. Physiopathologie.....	35
3.1 Mécanismes physiopathologiques à l'échelle tissulaire	35
3.1.1 <i>Action traumatique</i>	35
3.1.2 <i>Action chimique</i>	35
3.1.3 <i>Action spoliatrice</i>	36
3.1.4 <i>Action antigénique</i>	36
3.2 Mécanismes physiopathologiques à l'échelle de l'organisme	36
3.2.1 <i>Modification de l'ingestion</i>	36
3.2.2 <i>Défaut d'absorption</i>	36
3.2.3 <i>Perturbation du métabolisme</i>	37

3.3	Réponses de l'hôte à l'infestation	37
4.	Diagnostic	38
4.1	Dépistage des effets du parasitisme sur l'hôte	38
4.1.1	<i>Une détérioration de l'état corporel</i>	38
4.1.2	<i>Une modification des fèces : index de souillure et variation de consistance</i>	38
4.1.3	<i>Utilisation de la méthode FAMACHA®</i>	39
4.1.4	<i>Cas particulier : dosage du pepsinogène sanguin</i>	40
4.2	Détection des parasites.....	40
4.2.1	<i>Mise en évidence des œufs par l'analyse coproscopique</i>	40
4.2.2	<i>Mise en évidence des larves : coproculture</i>	44
4.2.3	<i>Détection de l'ADN et identification moléculaire du parasite : PCR et qPCR</i>	45
4.2.4	<i>Dépistage post-mortem : l'autopsie</i>	46
5.	Les méthodes de lutte chimique : utilisation des anthelminthiques en France	47
5.1	Benzimidazoles et dérivés.....	47
5.2	Imidazothiazoles et Tétrahydropyridines	48
5.3	Salicylanilides.....	49
5.4	Lactones macrocycliques	50
5.5	Dérivés d'aminoacétonitrile	51

PARTIE 2 : LA RESISTANCE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX DES OVINS AUX ANTHELMINTHIQUES CHIMIQUES

1.	Introduction et définition des résistances aux anthelminthiques.....	55
2.	Prévalence des résistances en France et dans le monde.....	56
2.1	En France	56
2.2	Dans le reste du monde	57
2.2.1	<i>A l'échelle de l'Europe</i>	57
2.2.2	<i>A l'échelle du monde</i>	58
3.	Mécanismes de chimiorésistance.....	59
3.1	Mécanismes non-spécifiques	59
3.2	Mécanismes spécifiques	59
3.2.1	<i>Résistance aux Benzimidazoles (BZ)</i>	59
3.2.2	<i>Résistance aux Imidazothiazoles</i>	60
3.2.3	<i>Résistance aux Lactones Macrocycliques</i>	60
3.2.4	<i>Résistance aux Salicylanilides</i>	61
3.2.5	<i>Résistance aux dérivés d'amino-acétonitriles</i>	61
4.	Facteurs favorisant l'apparition de résistances et leurs transmissions	61
4.1	Facteurs biologiques et génétiques	61
4.1.1	<i>Facteurs biologiques</i>	61

4.1.2	<i>Facteurs génétiques</i>	62
4.2	Conduite d'élevage.....	62
4.2.1	<i>Fréquence des traitements</i>	62
4.2.2	<i>Dosage des traitements</i>	63
4.2.3	<i>Rémanence des molécules</i>	63
4.2.4	<i>Introduction de nouveaux animaux</i>	63
4.2.5	<i>Traitements non sélectifs - systématiques</i>	64
5.	Mise en évidence d'une résistance.....	64
5.1	Tests in vivo	64
5.1.1	<i>FECRT ou test de réduction de l'excrétion fécale post-traitement</i>	64
5.1.2	<i>Infestation expérimentale</i>	66
5.2	Tests in vitro.....	67
5.2.1	<i>Egg Hatch Test (EHT) ou test d'éclosion d'oeufs</i>	67
5.2.2	<i>Test de développement larvaire</i>	67
5.2.3	<i>PCR et séquençage génétique</i>	68
6.	Prévention de l'apparition de résistance	69
6.1	Stratégies au pâturage	69
6.1.1	<i>La prévention</i>	69
6.1.2	<i>L'évasion</i>	69
6.1.3	<i>La dilution</i>	70
6.2	Gestion de la charge parasitaire.....	70
6.2.1	<i>Notion de « refuge »</i>	70
6.2.2	<i>Traitements anthelminthiques raisonnés</i>	71
7.	Alternatives aux traitements chimiques	72
7.1	La vaccination	72
7.2	La sélection génétique	72
7.3	L'utilisation de tannins condensés	73
7.4	Utilisation de champignons nématophages	73
PARTIE 3 : DYNAMIQUE DES POPULATIONS ET RESISTANCE DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX AUX ANTHELMINTHIQUES, PRE ET POST TRANSHUMANCE, AU SEIN DE DEUX ESTIVES PYRENEENE.		
1.	Introduction	77
2.	Matériels et méthodes	78
2.1	Description des élevages participant à l'étude.....	78
2.2	Description de l'estive des Hautes-Pyrénées.....	78
2.3	Manipulations en élevage.....	79
2.3.1	<i>A J0</i>	79

2.3.2	<i>A J14</i>	82
2.3.3	<i>En estive</i>	82
2.4	Manipulations en laboratoires.....	83
2.4.1	<i>Coproscopies de mélange</i>	83
2.4.2	<i>Cultures et comptages larvaire</i>	83
2.4.3	<i>PCR temps réel</i>	84
3.	Résultats et interprétations.....	87
3.1.	Calcul des FECR.....	87
3.1.1	<i>FECR antérieurs à la transhumance (mai 2019), estive des Hautes-Pyrénées</i>	87
3.1.2	<i>FECR faisant suite à la transhumance, estive des Hautes-Pyrénées</i>	89
3.1.3	<i>Description des résultats de FECR dans l'estive des Hautes-Pyrénées</i>	91
3.2	Comptages larvaires	92
3.2.1	<i>Comptage au microscope avant et après la transhumance, estive des Hautes-Pyrénées</i>	92
3.2.2	<i>Identification et quantification des larves de SGI par PCR temps réel pré et post transhumance, estive des Hautes-Pyrénées</i>	95
3.2.3	<i>Description des résultats des comptages larvaires microscopique et PCR temps réel</i>	97
3.3	Identification des espèces de strongles par qPCR.....	98
3.3.1	<i>Antérieure à la transhumance, estive des Hautes Pyrénées</i>	98
3.3.2	<i>Faisant suite à la transhumance, estive des Hautes-Pyrénées</i>	100
3.3.3	<i>Interprétation</i>	102
3.4	Bilan des prélèvements d'estive, Hautes-Pyrénées	104
3.5	Cas de l'Ariège.....	106
3.5.1	<i>Calcul des FECR</i>	106
3.5.2	<i>Comptages larvaires manuel et PCR</i>	109
3.5.3	<i>Identification des espèces de strongles par PCR</i>	111
3.5.4	<i>Bilan des prélèvements d'estive, Ariège</i>	113
4.	Discussion.....	115
4.1	Réalisation expérimentale	115
4.1.1	<i>La formation des lots</i>	115
4.1.2	<i>FECR</i>	115
4.1.3	<i>Culture larvaire</i>	117
4.1.4	<i>qPCR</i>	118
4.2	Etude individuelle de l'efficacité des molécules testées	119
4.2.1	<i>Fenbendazole</i>	119
4.2.2	<i>Ivermectine</i>	120
4.2.3	<i>Moxidectine</i>	120

4.2.4	<i>Lévamisole</i>	121
4.2.5	<i>Closantel</i>	121
4.2.6	<i>MonépanTEL</i>	121
4.3	Prélèvements en estive	122
4.4	L'estive, un rôle dans la transmission inter-élevage des résistances ?	122
	Conclusion	125
	Références bibliographiques	127
	ANNEXES.....	135

Table des figures

Figure 1 : Classification des nématodes susceptibles d'induire des strongyloses chez les ovins (Tanguy, 2011 ; Bussiéras, Chermette 1995).	25
Figure 2 : Températures de développement des larves L3, pour les 3 espèces de strongles gastro-intestinaux (O'Connor, 2006)	33
Figure 3 : Chronologie de contamination des pâtures par les œufs et les larves de strongles (Abbot, Taylor, Stubbingd, 2012).	35
Figure 4 : Echelle de notation de l'index de souillure (Bonfont, Canellas, 2014)....	39
Figure 5 : Carte permettant d'évaluer la note FAMACHA®	40
Figure 6 : Visualisation d'un œuf de strongle au microscope (Jacquet 2018).....	41
Figure 7 : Schéma d'une lame de McMaster.	42
Figure 8 : Schéma de la réalisation d'une coproscopie de mélange (Jacquet, 2018).	43
Figure 9 : Formes adultes d'H. contortus à la surface d'une muqueuse d'abomasum (http://sciencewatch.com).....	47
Figure 10 : Description des lots réalisés au sein des différents élevages de l'estive des Hautes Pyrénées, lors des prélèvements réalisés avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).....	80
Figure 11: Description des lots réalisés au sein des différents élevages de l'estive Ariégeoise, lors des prélèvements réalisés avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (octobre).....	81
Figure 12 : Représentation schématique d'une plaque PCR	85

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification et localisation des principaux strongles digestifs (inspiré de Lefèvre et al, 2003).....	27
Tableau 2 : Eléments d'identification de larves L3 (Lefèvre et al, 2003).....	45
Tableau 3 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage des benzimidazoles en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).....	48
Tableau 4 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage du lévamisole en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).....	49
Tableau 5 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage des salicylanilidés en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).....	50
Tableau 6 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage des lactones macrocycliques en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).	51
Tableau 7 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage du monépanтел en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).....	52
Tableau 8 : Fréquence de la résistance des SGI dans les élevages ovins en France selon la région et le type d'anthelminthique (adapté de Bordes et al.,2020 et Richelme and Greil, 2019).	57
Tableau 9 : Historique de l'apparition de résistances en élevage ovin dans le monde (Kotze, Prichard, 2016).	58
Tableau 10 : représentation des rencontres possibles entre les différents troupeaux, au cours de la période d'estive.....	79
Tableau 11 : Dosage des différentes molécules et spécialités pour chaque lot.....	82
Tableau 12 : FECR calculés à partir des coproscopies de mélange J0 et J14, avant la montée en estive	88
Tableau 13 : FECR calculés à partir des coproscopies de mélange J0 et J14, après le passage en estive	90
Tableau 14 : Comptage larvaire au microscope des coprocultures des différents lots des élevages de l'estive des Hautes Pyrénées, avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).....	94
Tableau 15 : Comptage larvaire par PCR des coprocultures des différents lots des élevages de l'estive des Hautes Pyrénées, avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).....	96
Tableau 16 : Abondance relative des trois espèces dans les coprocultures en % des lots incubés avant la montée en estive	99

Tableau 17 : Abondance relative des trois espèces dans les coprocultures en % des lots incubés après la descente de l'estive.	101
Tableau 18 : Résultats FEC, comptages larvaires manuels et qPCR, et analyse des espèces parasitaires présentes, sur les prélèvements faits en estive, Hautes-Pyrénées.	104
Tableau 19 : Résultat des FECR des élevages d'Ariège participant avant la transhumance.....	107
Tableau 20 : Résultat des FECR des élevages d'Ariège participant après la transhumance.....	107
Tableau 21 : Comptage larvaire manuel des élevages de l'estive d'Ariège, avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).....	110
Tableau 22 : Comptage larvaire par PCR des élevages de l'estive d'Ariège, avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).	110
Tableau 23 : Répartition des populations parasitaires en %, des lots incubés avant la montée en estive	112
Tableau 24 : Répartition des populations parasitaires en %, des lots incubés après la descente de l'estive.....	112
Tableau 25 : Résultats FEC, comptages larvaires manuels et qPCR et analyse des espèces parasitaires présentes, sur les prélèvements faits en estive, Ariège	114

Table des annexes

Annexe 1 : Guide pour établir la NEC chez les ovins.	137
Annexe 2 : Clé de détermination des principaux strongles gastro-intestinaux chez les ovins, d'après Van Wyk, Mayhew 2013	138
Annexe 3 : Principe de la technologie PCR	139
Annexe 4 : Principe de la technologie TaqMan en qPCR	139
Annexe 5 : Formules pour le calcul de l'IC95, à partir de la formule FECR ₂	140
Annexe 6 : Formules pour le calcul de l'IC95, à partir de la formule FECR ₁ (Falzon et al. 2015).....	141
Annexe 7 : Répartition géographique du cheptel ovin en France.....	142
Annexe 8 : Répartition des brebis et des éleveurs allaitants au sein de la zone Pyrénéenne	142
Annexe 9 : Relevé météorologique de la station Tarbes – Lourdes – Ossun, sur la période estivale 2019.....	143
Annexe 10 : Exemple d'un tableau de répartition de brebis au sein des différents lots, réalisé lors d'une visite J0	143
Annexe 11 : Protocole d'extraction d'ADN utilisé lors de cette étude	144
Annexe 12 : Détail des sondes et amorces utilisées, d'après Milhes et al, 2017	145
Annexe 13 : Exemple de plan de plaque	146
Annexe 14 : Exemple de regroupement de différents élevages au sein différentes plaques.....	147
Annexe 15 : Courbes standards, respectivement concernant <i>H. contortus</i> , <i>T. circumcincta</i> et <i>T. colubriformis</i> , obtenues à l'issue d'une des PCR de l'étude.....	147
Annexe 16 : Tableau récapitulatif par élevage de l'ensemble des résultats obtenus, au sein de l'estive des Hautes-Pyrénées.....	148
Annexe 17 : Tableau récapitulatif par élevage de l'ensemble des résultats obtenus, au sein de l'estive Ariégeoise	152
Annexe 18 : Description de projet de thèse présenté aux éleveurs.	154
Annexe 19 : Questionnaire à destination des éleveurs.....	155
Annexe 20: Exemple de fiche bilan transmise aux élevages à la fin de l'étude, ici exemple élevage B'.....	156

Introduction :

Les nématodes parasites sont responsables de pathologies majeures chez les animaux de rente, et ce quelle que soit la région du monde. Ils entraînent des pertes économiques importantes, notamment liées à des baisses de production ; ainsi que des signes cliniques graves, allant d'une baisse de l'appétit jusqu'au décès de l'animal lors d'infestation massive. Les petits ruminants, se révèlent particulièrement sensibles à certaines espèces de ces nématodes parasites.

Afin de prévenir et de traiter ces parasitoses, plusieurs molécules anthelminthiques ont été synthétisées, dès 1950. Cependant, leur utilisation massive et systématique, a entraîné une adaptation des parasites à ces molécules, engendrant ainsi des résistances sur tous les continents.

A l'heure actuelle, cette perte d'efficacité constitue un vrai problème au sein des élevages ovins. S'ajoute à cela, la forte pression sociétale à laquelle doivent faire face les éleveurs, en faveur d'une diminution importante de l'utilisation de molécules de synthèse au sein des élevages, dans un but de préservation de l'environnement et du bien-être animal notamment. La filière ovine doit désormais s'adapter, revoir certaines pratiques d'élevage et s'orienter rapidement vers une utilisation raisonnée des traitements anthelminthiques. Pour ce faire, des connaissances précises sont nécessaires, notamment sur la prévalence des résistances aux anthelminthiques déjà présentes, ainsi que sur les modalités d'apparition et de diffusion de celles-ci au sein et entre les élevages.

La filière ovin viande, très présente dans les Pyrénées, concentre de nombreux élevages aux abords des zones de montagne. Cette concentration s'explique notamment par la pratique possible et répandue de la transhumance, dans ces zones si particulières. Cette pratique consiste à réunir les élevages d'une même aire géographique au sein de pâtures communes, durant l'été, dans les montagnes. Le rôle de ce passage en estive, très peu étudié dans la diffusion des résistances aux anthelminthiques, fait partie des principales questions ayant motivées la réalisation de cette étude.

Après une partie bibliographique, s'intéressant à la biologie des strongles, aux moyens de lutte et à l'émergence de résistances, nous présenterons l'enquête réalisée dans les élevages composant deux estives, l'une dans les Hautes-Pyrénées et l'autre en Ariège, sur les résistances aux anthelminthiques. Ainsi, cette partie expérimentale a suivi deux objectifs majeurs, tout d'abord la réalisation d'un état des lieux des résistances présentes au sein des différents élevages participants. Ensuite, la détermination du rôle que pourrait ou non jouer les estives dans des échanges de parasites résistants entre les élevages.

**PARTIE 1 : BIOLOGIE DES STRONGLES
GASTRO-INTESTINAUX ET MAITRISE DES
STRONGYLOSES INDUITES CHEZ LES
OVINS**

1. Classification et biologie des strongles gastro-intestinaux des ovins

1.1 Classification

Parmi les nématodes gastro-intestinaux, les strongles gastro-intestinaux (SGI) représentent l'une des principales causes d'atteinte de l'état général et de perte de production chez les ovins. Cette altération de l'état général peut se traduire notamment par de la diarrhée ou de l'anémie. Il s'agit de maladies liées au pâturage, qui affectent les jeunes individus mais également les adultes. Elles sont saisonnières, et causées par le développement de nématodes de l'ordre des Strongylida, dans la paroi et la lumière du tractus digestif de l'espèce hôte (caillette, intestin grêle ou colon selon l'espèce).

<ul style="list-style-type: none">- Embranchement : Nematoda- Classe : Secernentea- Ordre : Strongylida<ul style="list-style-type: none">- Super famille : Trichostrongyloidea<ul style="list-style-type: none">- Famille : Trichostrongylidae<ul style="list-style-type: none">- Genre : <i>Haemonchus</i>, <i>Trichostrongylus</i>, <i>Teladorsagia</i>, <i>Cooperia</i>, <i>Nematodirus</i>- Super famille : Strongyloidea<ul style="list-style-type: none">- Famille : Strongylidae<ul style="list-style-type: none">- Genre : <i>Oesophagostomum</i>, <i>Chabertia</i>- Famille : Ancylostomatidae<ul style="list-style-type: none">- Genre : <i>Bunostomum</i>
--

Figure 1 : Classification des nématodes susceptibles d'induire des strongyloses chez les ovins (Tanguy, 2011 ; Bussiéras, Chermette 1995).

L'ordre des Strongylida se caractérise par une taille et un calibre réduit, une capsule buccale plus ou moins développée selon les genres, et une bourse caudale soutenue par des côtes musculueuses et munie de deux spicules chez les mâles.

Comme mentionné dans la Figure 1, l'ordre des Strongylida se divise en deux super-familles:

- les Trichostrongyloidea, pour lesquels la capsule buccale est rudimentaire   absente, et comprenant de nombreux genres d'intérêt en médecine vétérinaire. Toutes ces espèces se localisent exclusivement dans la caillette ou l'intestin grêle
- les Strongyloidea, possédant une capsule buccale développée et dont les espèces se localisent dans le colon. (Jacquet, 1997)

Chez les petits ruminants, en considérant la fréquence et la pathogénicité, il est possible de distinguer trois espèces majeures : *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Il y a généralement présence de plusieurs espèces de strongles simultanément, dans différents organes, chez un même individu. C'est le poly-parasitisme. Cependant, les trois espèces majeures citées précédemment peuvent présenter un certain pouvoir pathogène seules.

Les trois espèces citées ci-dessus étant très majoritaires dans les régions tempérées, c'est sur l'analyse de ces dernières que s'est basé l'étude précédemment évoquée.

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>	Ostertagiinés	<i>Ostertagia</i>	<i>axei</i>	Bovins, Ovins, Caprins, Equidés, Porcin	Abomasum	Cosmopolite
						<i>colubriformis</i>	Ovins, Caprins (Bovins)		
						<i>vitrinus</i>	Ovins, Caprins		
						<i>capricola</i>	Ovins, Caprins		
						<i>probolurus</i>	Camélins (Ovins, Caprins, Bovins)		
						<i>leptospicularis</i>	Cervidés (Ovins)		
		Ostertagiinés	<i>Teladorsagia</i>	<i>circumcincta</i>	Ovins, Caprins	Abomasum	Zones tempérées		
								<i>curticei</i>	Ovins, Caprins
		Cooperiinés	<i>Cooperia</i>	Cooperiinés	<i>Cooperia</i>	<i>oncophora</i>	Bovins	Intestin grêle	Cosmopolite
						<i>punctata</i>	Bovins		
						<i>pectinata</i>	Bovins		
						<i>filicollis</i>	Ovins, Caprins (Bovins)		
		Nematodiriné	<i>Nematodirus</i>	Nematodiriné	<i>Nematodirus</i>	<i>spathiger</i>	Ovins, Caprins (Bovins)	Intestin grêle	Cosmopolite
<i>battus</i>	Ovins (Bovins)								
<i>battus</i>	Ovins (Bovins)								
Strongyloidea	Strongylidés	Chabertiinés	<i>Chabertia</i>	<i>ovina</i>	Ovins, Caprins (Bovins)	Colon	Cosmopolite		
								Trichonématidés	Oesophagostomatiinés
	<i>venulosum</i>	Ovins, Caprins							
	<i>radiatum</i>	Bovins, Buffle							

Tableau 1 : Classification et localisation des principaux strongles digestifs (inspiré de Lefèvre et al, 2003).

1.2 Cycle de développement commun aux strongles gastro-intestinaux

Les strongyloses gastro-intestinales sont présentes partout dans le monde, et particulièrement dans les régions au climat humide. Ce sont des maladies contractées au pâturage, pour lesquelles la transmission des parasites est favorisée par les pluies et l'humidité. Il y a donc un caractère saisonnier et, en France, les périodes à haut risque d'infestation sont la fin de printemps/début d'été ainsi que l'automne. Concernant le cycle biologique des Trichostrongylidae, il est assez similaire pour toutes les espèces appartenant à cette famille.

C'est un cycle monoxène, dont l'hôte définitif est un ruminant (un ovin pour la suite de cet exposé). Ainsi, le parasite n'a pas besoin de l'intervention d'hôte(s) intermédiaire(s) pour réaliser son cycle. Le cycle est divisé en deux phases : une phase interne (ou parasitaire) chez l'hôte définitif, et une phase externe (ou libre) dans l'environnement.

1.2.1 La phase parasitaire

La phase parasitaire débute par l'ingestion d'herbe sur laquelle se trouve une larve L3 infestante. La larve L3, ainsi déglutie, arrive dans le tube digestif proximal (rumen ou caillette), et sous l'action du pH notamment, perd l'exuvie (ou gaine) de la larve 2 qui l'entoure encore. La larve migre ensuite dans la muqueuse digestive, où elle subit une mue afin de passer au stade de larve L4. La nouvelle larve L4 a alors deux possibilités, ressortir dans la lumière de l'organe qu'elle parasite (caillette, intestin grêle ou gros intestin selon le parasite) ou retarder son développement par le phénomène d'hypobiose.

Si la larve rejoint la lumière du tube digestif, elle se transforme en stade immature puis en ver adulte, environ 17 à 20 jours après contamination. Après fécondation, les femelles pondent des œufs qui sont éliminés avec les fèces, directement dans le milieu extérieur.

Ainsi, la période prépatente, qui correspond à la durée entre l'ingestion des larves infestantes par l'hôte et l'excrétion des premiers œufs, est en général de 3 semaines (Bowman, 1999). Quant à la survie des adultes au sein de l'hôte, elle est variable selon les espèces, les adultes d'*Haemonchus contortus* et de *Teladorsagia circumcincta* survivent quelques mois, tandis que ceux de *Trichostrongylus colubriformis* environ un an. (Jacquiet, 2018)

Dans le cas où les conditions (température ou hygrométrie par exemple) ne sont pas favorables au bon déroulement du cycle, la larve L4 peut subir le phénomène d'hypobiose larvaire. Ce phénomène est défini comme un arrêt temporaire du cycle de développement du parasite, à un moment précis. Cette interruption du cycle est facultative, elle ne survient que chez certains animaux et dans certaines circonstances. Le stimulus initiant l'arrêt du développement peut être exogène (notamment à certaines périodes de l'année) ou lié à un processus immunologique (résistance de l'hôte). Pour les espèces qui nous intéressent, le stimulus décrit est le plus souvent environnemental. Il concerne les larves au stade L4 qui restent ainsi enkystées dans la muqueuse durant l'hiver et ce jusqu'au printemps (Balic et al., 2000).

Plusieurs éléments doivent être mis en évidence simultanément afin de pouvoir parler d'hypobiose (Lefèvre et al., 2003):

- Les larves inhibées retrouvées au sein de l'hôte doivent être au même stade du cycle évolutif et celui-ci est caractéristique de l'espèce.

- Les larves arrêtent leur cycle de développement en ralentissant leur métabolisme et deviennent inactives. Ce phénomène peut se produire à même la surface de l'organe ou bien plus en profondeur dans les glandes de la muqueuse digestive ou dans la sous-muqueuse. Il n'y a pas d'atteinte liée à une quelconque réaction immunitaire de l'hôte et elles sont également moins sensibles aux anthelminthiques.
- Les larves inhibées représentent la forme majoritaire au sein de l'animal à ce moment précis de l'année. Le parasite demeure donc immature au sein de son hôte jusqu'à la levée d'hypobiose, dont le déterminisme précis reste encore mal connu.

1.2.2 *La phase libre*

La phase libre dans l'environnement débute par la présence d'œufs dans les fèces. Ces derniers, au stade morula, s'embryonnent, puis éclosent pour donner une larve L1. Lors de deux mues successives, une larve L2 puis une larve L3 infestante sont produites. La dernière mue, donnant naissance à la larve L3 infestante, est incomplète puisque la larve L3 reste engainée dans l'exuvie de la larve L2.

Concernant les larves L1 et L2, elles restent dans les matières fécales, ne pouvant pas se déplacer et y trouvant protection et nutrition. En effet, elles accumulent des réserves en se nourrissant de microparticules et de microorganismes, qui leurs seront particulièrement utiles pour le stade L3.

La larve L3, qui demeure dans l'exuvie de la larve L2, perd sa capacité à se nourrir et ne possède plus d'appareil valvulaire dans son œsophage. Elle survit donc grâce à des réserves glycogéniques et lipidiques, stockées au niveau des cellules intestinales. Cette forme de larve L3 est, toujours du fait de son engainement, particulièrement résistante dans l'environnement. Par la suite, lorsque les conditions seront optimales, la larve L3 pourra se déplacer afin d'effectuer deux migrations (Lefèvre et al., 2003). La première des migrations est horizontale, elle permet de sortir de l'anneau de répugnance entourant les matières fécales. La seconde migration est verticale, sur les brins d'herbes, pour permettre l'ingestion par l'hôte définitif. Ces deux migrations sont favorisées par un terrain humide, notamment avec la rosée. Elles ont pour finalité de permettre aux larves de se rendre disponibles et d'augmenter leurs chances d'ingestion.

La durée de la phase externe du cycle dépend des conditions environnementales (température et degré d'humidité notamment) mais elle est en général de 8 à 10 jours. En effet, l'éclosion de l'œuf survient au bout de 12-24 heures. La mue L1-L2 survient 30 à 60 heures après éclosion, et la mue L2-L3, 4-5 jours post éclosion. La durée minimale de la phase externe du cycle chez *Haemonchus contortus* dans les conditions optimales est de 3 à 4 jours (Zajac, 2006).

1.3 *Biologie des espèces majeures*

1.3.1 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus est le plus grand des strongles étudiés ici. En effet, une femelle adulte peut mesurer jusqu'à 30mm de long et 0.8mm de diamètre. Ajouté à cela sa couleur rouge, c'est un parasite visible à l'œil nu, au contact de la muqueuse de la caillette. Ses hôtes préférentiels sont les petits ruminants, mais il est également retrouvé chez certaines espèces de cervidés (chevreuil en particulier), et beaucoup plus rarement chez les bovins. Il représente l'espèce de strongle la plus prolifique, bien

que la durée de vie des adultes soit limitée à quelques mois au maximum (Coyne, Smith, Johnstone, 1991 ; Eichstadt, 2017).

En effet, les femelles sont capables de pondre en moyenne 5 000 à 7 000 œufs par jour, et, si les conditions sont optimales, la ponte peut avoisiner les 10 000 œufs par jour (Sutherland, Scott, 2010). C'est un parasite hématophage (au stade L4 et au stade adulte), dont chaque individu peut prélever 0,05ml de sang par jour, auxquels s'ajoutent les pertes sanguines induites par le suintement de sang de la muqueuse blessée par les vers. Ainsi, un animal infesté par 5000 individus peut perdre 250mL de sang par jour (Urquhart et al., 1996). De fait, des infestations massives peuvent induire de sévères anémies, pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal.

Pour son développement, les climats chauds et humides sont des facteurs favorisant au déroulement du cycle. En effet, si le climat est tropical, le développement de larves L3 après éclosion peut se dérouler en seulement 4-5 jours (Taylor et al., 2016). De plus, la survie des larves est également liée au climat puisque ces dernières sont particulièrement sensibles aux faibles températures et à la dessiccation. Ainsi, le développement est impossible si les températures sont inférieures à 10°C. Cependant, il ne faut pas négliger le phénomène d'hypobiose, évoqué précédemment, qui permet d'expliquer la présence d'*H. contortus* dans les zones tempérées froides et dans des zones tropicales à alternance saison sèche/saison des pluies.

1.3.2 *Teladorsagia circumcincta*

T. circumcincta est souvent décrit comme le "ver brun de l'estomac", il se localise donc dans la caillette, plus précisément dans les glandes gastriques pour les larves, origine majeure de la pathogénie (Eichstadt, 2017). Les femelles peuvent mesurer 10mm de longueur, le parasite est donc visible à l'œil nu même s'il est plus difficile à observer qu'*Haemonchus contortus*. A l'inverse d'*H. contortus*, il est spécifique des petits ruminants. C'est un ver histophage au stade larvaire et hématophage au stade adulte. Enfin, les femelles sont capables de pondre généralement entre 100 et 200 œufs par jour, selon les conditions rencontrées (Jacquiet, 2018).

Il est très bien adapté aux zones tempérées et tempérées froides. Les larves, moins sensibles à la dessiccation et aux basses températures que celles d'*H. contortus*, sont capables de survivre l'hiver dans le milieu extérieur, formant ainsi des larves trans-hivernantes (Sargison, 2016). De plus, les larves L4 de ce parasite sont également capables d'hypobiose durant l'hiver, causant des pathologies avant même la remise à l'herbe (Abbott et al., 2012; Bowman, 2014; Taylor et al., 2016 ; Fournier, 2019).

1.3.3 *Trichostrongylus colubriformis*

T. colubriformis est le plus petit des strongles étudiés ici, il mesure entre 4 et 6mm de long et n'est pas visible à l'œil nu. Il se localise au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle et est chymivore. C'est également l'espèce la moins prolifique puisque les femelles ne pondent pas plus de 100 œufs par jour (Zajac, 2006). Cependant, des 3 espèces parasites majeures, c'est celui dont la survie des adultes est la plus longue. Enfin, il est rarement seul, et se retrouve souvent en association avec d'autres parasites, notamment *T. circumcincta*.

C'est un parasite des régions tempérées et tropicales, dont la phase libre du développement est moins sensible à la dessiccation et aux basses températures

qu'*H. contortus* (O'Connor et al., 2006). L'hypobiose est possible, mais bien moins importante que pour *H. contortus*, les stades adultes étant capables de survivre durant l'hiver (Zajac, 2006). Enfin, des larves L3 pourront également survivre à la période hivernale, dans le milieu extérieur, donnant lieu à des larves trans-hivernantes (Bowman, 2014).

1.4 Signes cliniques et lésions suite à une infestation

Ces strongyloses provoquent des signes cliniques variés, et variables selon l'espèce impliquée et surtout l'importance de l'infestation. En effet, en cas d'infestation chronique, la diarrhée est très fréquemment mise en évidence (hormis lors d'infestations par *H. contortus*), associée à une perte de poids, pouvant aller jusqu'à la cachexie et un retard de croissance. Il peut y avoir également une baisse de la production chez les adultes. Tous ces signes peuvent finir par entraîner la mort de l'animal sur le long terme.

En ce qui concerne les particularités cliniques :

Pour *H. contortus*, du fait de son caractère hématophage, une haemonchose entraîne une anémie normochrome normocytaire au départ, évoluant vers une anémie hypochrome microcytaire. S'en suit l'apparition d'œdème au niveau des membres et en région sous mandibulaire (signe de la bouteille). Il existe des formes aiguës, suraiguës et chroniques.

- Les formes suraiguës sont peu fréquentes, mais la mort survient brutalement, sur des animaux en état, et fait suite à une importante gastrite hémorragique. Cette forme est observée lors d'infestations massives, de l'ordre de plusieurs dizaines de milliers d'individus (Lefèvre et al, 2003).
- Les formes aiguës se caractérisent par une diminution plus progressive de l'hématocrite, avec plusieurs degrés d'œdèmes, notamment l'œdème de l'auge appelé signe de la bouteille. Les fèces sont plus sombres et les animaux généralement léthargiques.
- Les formes chroniques d'haemonchose se caractérisent tout d'abord par une diminution des productions (lait, perte de poids...), puis une intensification des signes avec une anorexie pouvant mener à la cachexie, accompagnée d'une anémie et d'œdème. La mort pourra survenir en plusieurs semaines.

Pour *T. colubriformis*, les formes aiguës concernent principalement les agneaux, qui s'infestent massivement au printemps. Une diarrhée verdâtre est associée à une déshydratation importante, ainsi qu'un amaigrissement, un retard de croissance et une mortalité possible. La forme chronique, se caractérise par des signes liés à la malnutrition.

Pour *T. circumcincta*, lors d'infestations majeures, en plus de la diarrhée, il est possible d'observer une anémie associée à une fuite protéique (hypoprotidémie) et une diminution de l'appétit (Zajac, 2006). La mort est possible pour les cas les plus graves. Lors d'infestations moins importantes, la diarrhée est intermittente et accompagnée d'une perte de poids.

A l'autopsie :

Concernant *H. contortus*, il est visible directement au niveau de la paroi de la caillette. La forme suraiguë est associée à des lésions telles qu'une hyperplasie et des nodules au niveau de la caillette, des pétéchies et des zones de nécrose dans la paroi notamment (Lefèvre et al., 2003).

Des nodules au niveau de la paroi de la caillette sont également observables pour les infestations à *T. circumcincta*. Ces nodules se localisent sur les glandes de la caillette, et sont liés à la présence de larves au sein des glandes, durant plusieurs semaines (Zajac, 2006).

Enfin pour *T. colubriformis*, les lésions sont localisées sur l'intestin grêle, avec une entérite congestive catarrhale ou exsudative, accompagnée d'une atrophie des villosités et microvillosités.

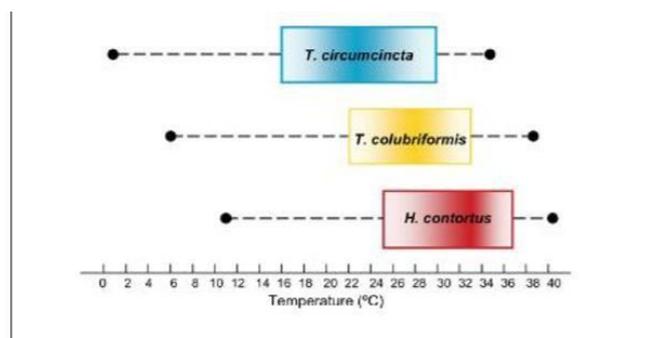
2. Epidémiologie et modalités d'infestations

2.1 Répartition géographique et temporelle des différents parasites

Pour *H. contortus*, l'optimum de développement est observé lors de périodes chaudes et humides, les larves ne supportant ni les basses températures ni la sécheresse. L'espèce est donc particulièrement présente dans les régions tropicales et sub-tropicales telles que l'Asie du Sud-Est, l'Afrique, l'Amérique centrale... Elle est, de plus, surtout présente durant la période estivale dans les zones où les précipitations sont importantes. Cependant, ce parasite parvient tout de même à se développer dans les zones à climat tempéré voire tempéré froid, en grande partie grâce aux phénomènes d'hypobiose.

En ce qui concerne *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, leurs stades libres se développent à des températures plus basses, et sont moins sensibles à la dessiccation. C'est pour cela qu'ils sont dominants en hiver et au début du printemps, dans les zones pluvieuses et tempérées. *T. colubriformis* est le plus cosmopolite, il peut également être retrouvé en zones subtropicale et tropicale.

Ainsi, il existe pour chaque espèce, une association de température et d'hygrométrie optimale pour le déroulement de la phase libre du cycle. Le déroulement de cette phase demeure possible avec d'autres conditions climatiques, mais il sera plus long.



Les boîtes représentent les températures idéales de développement, les pointillés représentent les températures pour lesquelles le développement est possible, enfin, la zone la plus colorées représente l'optimum de développement.

Figure 2 : Températures de développement des larves L3, pour les 3 espèces de strongles gastro-intestinaux (O'Connor, 2006).

2.2 Facteurs de réceptivité et sensibilité chez les ovins

Il y a plusieurs facteurs à prendre en compte.

Pour commencer la race, une étude de Beh et al. (2002) a mis en évidence des capacités de résistance variables entre les races. En effet, selon eux, la race Romanov serait moins sensible aux infestations par les strongles gastro-intestinaux que les races Lacaune ou Mérinos d'Arles. Ce caractère se transmettant de manière héréditaire, la sélection génétique pourrait constituer un outil de contrôle par l'obtention d'animaux plus résistants aux strongles gastro-intestinaux.

L'âge est également un paramètre à prendre en compte, les jeunes étant plus sensibles que les adultes. En effet, ils hébergent un nombre généralement plus important de parasites, et présentent des signes cliniques plus sévères. Ce sont les infestations successives qui permettent la mise en place d'une immunité.

Les pathologies intercurrentes, et principalement les défauts d'alimentation, peuvent également impacter la sensibilité des brebis, et induire une reprise de ponte des parasites adultes (Lefèvre et al. 2003). Par exemple les défauts de transition alimentaire ou encore les sous alimentations et carences en protéines ne sont pas à négliger.

Concernant le statut physiologique, les périodes clés de la gestation et de la lactation sont à considérer. En effet, il y a une baisse importante d'immunité centrée sur l'agnelage, durant environ 8 semaines (4 semaines avant et 4 semaines après l'agnelage), c'est le « periparturient rise », décrit par les auteurs anglo-saxons. Au cours de cette période, l'infestation est facilitée et la prolificité des parasites déjà présents augmente (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

Enfin, il existe des variations individuelles, avec des animaux plus résistants que d'autres. C'est en partie pour cette raison qu'environ 80% des strongles dans un élevage sont hébergés par seulement 20% des individus (Shaw, Dobson, 1995).

2.3 Source de transmission, d'infestation et causes favorisantes

La principale source de parasites est constituée par les ovins eux-mêmes, puis secondairement par les larves ayant survécu à l'hiver sur la pâture. Comme évoqué précédemment, les vers femelles, durant la période de « periparturient rise », ont un rôle majeur dans la contamination des pâtures lorsque l'agnelage a lieu au printemps. De même que les jeunes agneaux, dans la multiplication des larves présentes sur la pâture, en raison de leur immaturité immunitaire.

Etant donné les sources de transmission, il y a des facteurs favorisants, dont il faut essayer de limiter l'impact. Tout d'abord, un paramètre sur lequel il est impossible d'agir : le climat. En effet, comme abordé sous partie 2.1, les températures douces et l'atmosphère humide favorisent le développement des œufs en larves. L'infestation de la pâture par des larves L3 est donc plus rapide dans ces cas-là. Cependant, les pluies et la pousse rapide de l'herbe vont, quant à elles, induire un effet de dilution des œufs sur la pâture, ce qui peut modérer l'intensité d'infestation.

Le surpâturage est un facteur de risque majeur, qu'il soit induit par un nombre trop important d'animaux pour une parcelle et/ou lorsque ces derniers y restent trop longtemps. Les ovins se mettent alors à brouter l'herbe au ras du sol, augmentant ainsi les probabilités de contact, et donc d'infestation par des strongles gastro-intestinaux. De plus, la présence de nombreux animaux augmente logiquement le nombre d'œufs et donc de larves sur la parcelle.

La présence d'agneaux sur des parcelles fortement contaminées constitue également une cause favorisante, induisant alors des pathologies cliniques et une infestation massive du pâturage.

2.4 Chronologie de l'infestation

Le cycle parasitaire redémarre au printemps, en partie grâce aux larves L3 qui ont survécu à l'hiver, elles constituent une des sources du recyclage parasitaire. Le nombre de larves en fin d'hiver dépend des conditions climatiques de l'hiver, de la quantité de larves présentes à l'automne, de l'intensité du pâturage précédent...

C'est à cette période que les brebis sont généralement mises à l'herbe, et cela correspond souvent à la période d'agnelage. Ainsi, les mères en « periparturient rise » participent à l'ensemencement des pâtures, alors que les jeunes agneaux, particulièrement sensibles au parasitisme, s'infestent massivement.

Etant donnée les conditions climatiques à cette période, le développement des œufs en larves est plutôt ralenti. De fait, la contamination prend du temps, et les premiers signes cliniques apparaissent environ 2 mois après la mise à l'herbe. Une fois infestés, les jeunes agneaux sont des multiplicateurs majeurs, jouant un rôle important dans l'infestation des pâtures. Il y a alors un pic larvaire en été, corrélé avec des signes cliniques qui atteignent leur maximum à la fin de l'été (Abbot, Taylor, Stubbings, 2012).

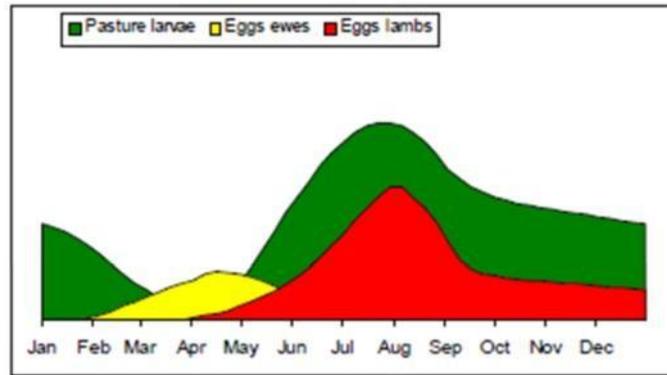


Figure 3 : Chronologie de contamination des pâtures par les œufs et les larves de strongles (Abbot, Taylor, Stubbingd, 2012).

3. Physiopathologie

3.1 Mécanismes physiopathologiques à l'échelle tissulaire

La présence de strongles dans l'appareil digestif s'accompagne d'actions pathogènes ayant plusieurs origines : traumatique, chimique, spoliatrice et antigénique (Lefèvre et al., 2003).

3.1.1 *Action traumatique*

Tout d'abord, il y a une action mécanique de la part de certains strongles, notamment d'*H. contortus*. En effet, il est capable d'utiliser une lancette acérée, située à son orifice buccal, pour dilacérer la muqueuse de la caillette, atteindre et rompre les vaisseaux de la lamina propria afin de se nourrir de sang.

Pour les strongles chymivores, suite à un contact étroit entre leur cuticule et les villosités intestinales, ils sont responsables d'une abrasion de ces dernières.

Enfin, la migration des larves L4 au sein de la muqueuse digestive entraîne une compression ainsi qu'une dissociation des assises cellulaires, et une atteinte des cryptes glandulaires (obstruction).

3.1.2 *Action chimique*

Une grande partie des lésions est induite par l'action chimique des produits d'excrétion-sécrétion, émis par les adultes et les larves. Ces substances jouent plusieurs rôles, notamment en ce qui concerne la survie, la reproduction ou encore le développement des strongles gastro-intestinaux.

Tout d'abord *H. contortus* produit des cystéines protéases, qui lui permettent d'hydrolyser la trame conjonctive et ainsi d'accéder aux capillaires sanguins de la lamina propria pour se nourrir. D'autres cystéines protéases entraînent une dégradation de l'hémoglobine, du fibrinogène et du plasminogène, ce qui facilite l'ingestion et la digestion du repas sanguin.

Les adultes de *T. circumcincta* excrètent des métalloprotéases, qui leur permettent de dissoudre les protéines de la trame conjonctive, notamment les chaînes de fibrinogène. En revanche, au stade larvaire, ce parasite n'excrète pas tout à fait les mêmes types de molécules car son alimentation est différente (chymivore jusqu'au stade L4). Il y a donc ici une démonstration de l'adaptation des strongles durant leur cycle.

3.1.3 *Action spoliatrice*

Cette action est surtout présente pour les parasites hématophages, elle concerne donc essentiellement *H. contortus* et dans une moindre mesure, *T. circumcincta*. En effet, lors de repas de sang, les sécrétions émises ont des propriétés anesthésiques, anticoagulantes et thrombolytiques, ce qui entraîne un saignement de la muqueuse digestive. Ces saignements chroniques provoquent, sur le long terme, une diminution des réserves en fer de l'organisme et une anémie non régénérative.

3.1.4 *Action antigénique*

Chez les animaux non encore immunisés, la perte de la gaine de L2 par les larves L3, les produits de mues, ainsi que les diverses substances excrétées peuvent entraîner une forte réaction immunitaire et inflammatoire chez l'hôte. En effet, la reconnaissance de ces antigènes entraîne la dégranulation des mastocytes de la lamina propria. Cette dégranulation conduit à la formation d'amines toxiques et d'une production accrue de mucus.

La réaction inflammatoire qui se met alors en place a pour but d'éliminer le parasite, cependant elle peut également causer de la diarrhée.

Certains parasites, comme *T. circumcincta*, sont capables de contourner cette réaction inflammatoire grâce à une activité super oxyde dismutase qui neutraliserait l'anion superoxyde (O_2^-), radical libre impliqué dans l'élimination des parasites.

3.2 Mécanismes physiopathologiques à l'échelle de l'organisme

A l'échelle de l'organisme, il est possible d'observer des affections concernant principalement l'assimilation de l'alimentation avec une baisse de l'ingestion, un défaut d'absorption et une modification du métabolisme.

3.2.1 *Modification de l'ingestion*

Lors d'infestations par des SGI, il est fréquent d'observer une baisse d'appétit progressive pouvant mener jusqu'à l'anorexie. Cette diminution de prise alimentaire serait corrélée à la charge parasitaire de l'individu. En effet, il y aurait, en cas de parasitose digestive, surproduction par l'individu de certaines enzymes gastriques comme des cholécystokinines, qui auraient un effet sur le centre de la satiété.

Pour compenser cette diminution d'ingestion, les animaux modifient leur comportement en faisant du tri et sélectionnant des aliments avec une concentration protéique élevée.

3.2.2 *Défaut d'absorption*

Un défaut d'absorption faisant suite à une infestation par des strongles s'explique par différents phénomènes :

- Au niveau de la caillette, il y a des modifications histologiques des cryptes glandulaires et en particulier une diminution importante des cellules productrices d'HCl. Cette modification induit une augmentation du pH, qui a pour effet de dégrader le fonctionnement de certaines enzymes, et notamment la transformation du pepsinogène en pepsine.
- Au niveau de l'intestin grêle, l'abrasion des villosités induit une diminution de la surface de contact entre les nutriments et les enzymes digestives. De plus, il y a une perturbation de la motricité digestive. Enfin les lésions entraînées par les strongles, évoquées précédemment, ont pour conséquence une plus grande perméabilité des entérocytes et donc une fuite plasmatique vers la lumière digestive.

3.2.3 *Perturbation du métabolisme*

A la suite des lésions engendrées, le métabolisme se trouve modifié. En effet ce dernier, pour compenser les pertes induites et rétablir l'homéostasie sanguine, accroît la synthèse protéique au niveau du foie et des épithéliums digestifs.

Cette compensation se fait au détriment d'autres productions, comme les muscles par exemple, expliquant les pertes zootechniques.

3.3 Réponses de l'hôte à l'infestation

Pour faire face à une infestation parasitaire, l'organisme va chercher à se défendre de deux façons, utilisant la réponse immunitaire innée et adaptative.

Pour la réponse immunitaire innée, celle-ci repose sur une ligne de défense non spécifique, utilisée contre n'importe quel pathogène. Tout d'abord cette défense repose sur des caractéristiques spécifiques de l'intestin, comme le renouvellement rapide de son épithélium, la production de mucus ou encore le péristaltisme, qui permet d'expulser les agents pathogènes. Il y a également la reconnaissance de patterns moléculaires des pathogènes, les PAMPS (Pathogen-Associated Molecular Patterns), par des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules de l'immunité innée. Cette reconnaissance active des mécanismes de défense non spécifiques, comme la phagocytose, l'activation du système du complément, ou encore la sécrétion de cytokines par les macrophages....

Concernant la réponse immunitaire adaptative, elle se base d'abord sur la présentation aux lymphocytes T CD4+ (LTCD4+) d'un antigène parasitaire, par une cellule présentatrice d'antigène. Pour les nématodes gastro-intestinaux chez les ovins, la réponse immunitaire s'orienterait vers une prédominance de la réponse Th2, notamment en cas de ré-infestation (Schallig, 2000 ; Lacroux et al., 2006).

Il y a alors synthèse de différentes cytokines, permettant par exemple le recrutement de polynucléaires éosinophiles, ces derniers étant considérés comme les cellules protectrices de l'hôte en cas d'infestation parasitaire.

Enfin, il y a la synthèse de différentes immunoglobulines comme des IgA, des IgG ou des IgE. Les IgE permettent notamment de faire dégranuler des mastocytes, ce qui provoque une réaction d'hypersensibilité de type 1, permettant d'expulser les parasites par augmentation du péristaltisme et de la sécrétion d'eau et d'ions (Baird et O'Malley, 1993).

4. Diagnostic

4.1 Dépistage des effets du parasitisme sur l'hôte

4.1.1 *Une détérioration de l'état corporel*

Bien que peu spécifique des strongyloses, et opérateur dépendant, la variation de la note d'état corporel (NEC) peut constituer une alerte sur la présence de maladies parasitaires au sein d'un troupeau. La faible spécificité de cette méthode vient du fait qu'un amaigrissement chronique, responsable d'une diminution de la NEC, peut être induit par de nombreuses autres causes que les strongyloses. Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour pouvoir attribuer une note d'état corporel à un individu, en palpant la région lombaire : la proéminence des apophyses épineuses et transverses, le développement musculaire sous-lombaire et le développement de la noix. La note attribuée va de 0 à 5, avec 0 pour un animal cachectique, et 5 pour un animal obèse (Adjou K. 2013, voir Annexe 1). Pour avoir une idée générale sur le troupeau, il est recommandé dans l'idéal d'évaluer 10 à 20% des individus qui le composent. Cela sera cependant difficilement réalisable pour des troupeaux de taille trop importante. Ainsi, une diminution de la NEC, traduisant une perte de poids chez les adultes, doit amener à suspecter, entre autres, une strongylose digestive.

De plus chez les agnelles, le GMQ peut également servir d'indicateur, tout comme l'index de souillure de l'arrière-train, pour déterminer la nécessité ou non d'un traitement anthelminthique. Une étude (Stafford et al, 2009) a ainsi démontré qu'avec un GMQ fort, et un index de souillure faible, l'absence de traitement d'un lot n'entraînait pas de différences significatives concernant le poids en fin de pâture, comparé à un lot présentant les mêmes caractéristiques et ayant reçu un traitement anthelminthique.

4.1.2 *Une modification des fèces : index de souillure et variation de consistance*

De même que la NEC, cette méthode n'est pas spécifique, et doit donc être associée à d'autres éléments de suspicion. Une nouvelle fois, des notes entre 0 et 5 sont attribuées, selon l'intensité des souillures visibles sur l'arrière-train. Le postulat de base est que le parasitisme entraîne une élévation de l'index de souillure (Larsen et al, 1995). Cependant Bonnefont et Canellas (2014), n'ont pas observé dans leur étude de corrélation entre la note attribuée et l'intensité de l'excrétion fécale d'œufs.

Ainsi, même si cet index peut parfois être utilisé comme aide au dépistage des strongyloses (Jacquiet et al, 2014), plusieurs biais sont à considérer. Tout d'abord, la diarrhée n'est un symptôme ni sensible ni spécifique des strongyloses, par exemple un défaut alimentaire peut également l'induire. De plus, une haemonchose, même massive, ne se traduit pas par de la diarrhée chez les animaux atteints.

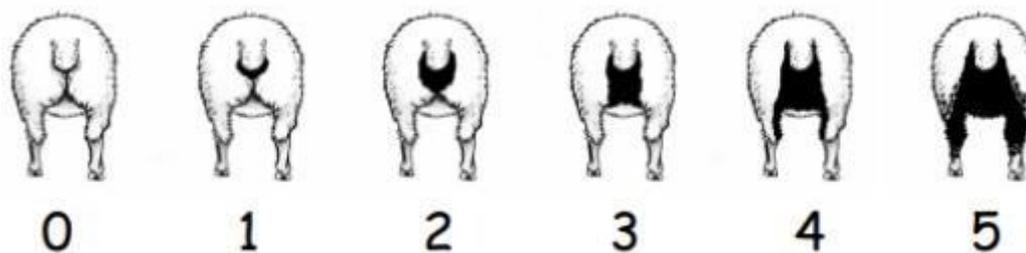


Figure 4 : Echelle de notation de l'index de souillure (Bonnefont, Canellas, 2014).

Concernant la consistance des fèces, Cabaret et al. (2006) ont établi un index DISCO permettant de scorer cette dernière entre 1 et 3. Par opposition à l'index de souillure, pour 80% des individus le DISCO est corrélé à l'intensité de l'excrétion fécale (Bentounsi et al, 2012). La note de 1 concerne des fèces normales, d'environ 40% de matière sèche (MS). La note de 2 indique des fèces ramollies, « en bouse de vache », pour 26% de MS. Et enfin la note de 3 s'applique aux fèces semi-liquides, avec 16% de MS (Cabaret et al, 2006).

Pour ces deux index, il faut garder en tête que les strongyloses ne sont pas les seules sources de diarrhées chez les ovins.

4.1.3 Utilisation de la méthode FAMACHA®

Ne concernant que les infestations par *H. contortus*, cette méthode, désormais régulièrement utilisée dans les régions chaudes et humides, a été développée en Afrique du Sud (Van Wyk et al, 2002). Elle se base sur la détermination de la couleur des muqueuses oculaires, en leur attribuant une note allant de 1 à 5. La note de 1 correspond à des muqueuses rouges, alors que la note de 5 est attribuée pour des muqueuses blanches. Etant donné le caractère hématophage d'*H. contortus*, l'anémie qui découle de l'infestation va se traduire par une modification de la couleur des muqueuses, du rouge au blanc, en passant par différentes nuances de rose.

Fondraz (2012) a démontré qu'il existait une corrélation entre la note attribuée avec cette méthode et l'hématocrite. En France, cette méthode est utilisée comme aide au dépistage de l'haemonchose (Jacquiet, Canellas et al, 2014) à l'échelle du troupeau uniquement. En effet, à l'échelle de l'individu, dans un traitement ciblé sélectif, elle se révèle trop consommatrice de temps de travail.



Figure 5 : Carte permettant d'évaluer la note FAMACHA®.

Cependant, d'autres maladies, comme la babésiose ou encore l'anaplasmosse, peuvent être responsables d'anémie, et donc induire la même modification de couleur des muqueuses oculaires. De fait, la spécificité de cette méthode n'est pas suffisante pour en faire une méthode diagnostic à elle seule. De plus, le changement de couleur des muqueuses est surtout détectable pour les notes de 4 et au-delà, or l'hématocrite est déjà, à ce stade-là, inférieur à 20%. Ce qui, en plus d'une spécificité moyenne, en fait une méthode moyennement sensible.

Ainsi, au même titre que les deux méthodes déjà citées précédemment (sous parties 4.1.1 et 4.1.2), la méthode FAMACHA® permet une suspicion de strongylose, et ici plus spécifiquement d'haemonchose, mais elle doit être intégrée dans un contexte global, avec d'autres examens complémentaires, pour mener à un diagnostic de certitude.

4.1.4 Cas particulier : dosage du pepsinogène sanguin

Une augmentation du dosage du pepsinogène sanguin peut signer une infection précoce, avec la présence de stades larvaires de *T. circumcincta* et *H. contortus* au sein de la caillette (Urquhart et al, 1996). En effet, comme vu précédemment (sous partie 1.3), la présence des L4 perturbe la conversion du pepsinogène en pepsine (par la diminution de l'acidité de la caillette), ce qui entraîne une augmentation du taux de pepsinogène sanguin circulant.

Il y a cependant un certain nombre de limites à cette méthode, notamment un certain défaut de spécificité. Ainsi, à l'heure actuelle, ce test est peu réalisé en routine (Jacquiet, Canellas et al, 2014).

4.2 Détection des parasites

4.2.1 Mise en évidence des œufs par l'analyse coproscopique

L'analyse coprologique, communément appelée coproscopie, est la recherche d'éléments parasitaires dans les matières fécales. En ce qui concerne le diagnostic des strongyloses gastro-intestinales, ce sont les œufs de strongles qui sont recherchés

dans les matières fécales. La coproscopie peut être qualitative, dans ce cas l'objectif est seulement de mettre en évidence la présence d'œufs dans les fèces. Mais il est également possible de faire des coproscopies quantitatives, et dans ce cas l'objectif est de dénombrer les œufs de strongles. Cette dernière, plus intéressante, permet de déterminer le niveau d'infestation, afin de mettre en place la gestion la plus appropriée possible au troupeau.

Bien que les œufs de strongles soient visibles sans difficultés au microscope après préparation, il est impossible de différencier les œufs des trois espèces majeures *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*. Pour faire la diagnose de ces différentes espèces, il faut avoir recours à la coproculture, puisque la diagnose n'est possible que sur les larves infestantes.



Figure 6 : Visualisation d'un œuf de strongle au microscope (Jacquiet 2018).

La technique de coproscopie comprend plusieurs étapes.

- Prélèvement de fèces et conservation

Dans l'idéal et dans la mesure du possible, le prélèvement doit être fait par voie rectale, avec un gant qui doit être changé entre chaque individu. Le prélèvement est ensuite placé dans un récipient hermétique individuel, une dizaine de grammes par individu sont nécessaires. Si le prélèvement par voie rectale n'est pas possible, seules des fèces fraîches trouvées au sol pourront être utilisées. Les échantillons doivent ensuite être conservés au réfrigérateur, à froid positif (+4°C) afin d'éviter l'évolution des œufs en larves (surtout pour *T. circumcincta*). La congélation n'est pas envisageable, en effet, les œufs pourraient éclater lors de la décongélation, ce qui constituerait un biais important.

- L'enrichissement

Il existe deux techniques d'enrichissement, la sédimentation et la flottation. La sédimentation (que nous ne détaillerons pas davantage) utilise la centrifugation pour former un culot contenant les éléments parasitaires, après dilution dans un liquide peu dense.

La technique de flottation utilise la dilution d'une petite quantité de fèces dans un liquide dense. Ainsi, les éléments parasitaires, de densité inférieure à celle du liquide, se concentrent à la surface. Dans le but d'observer des œufs de strongles, le liquide

de flottation doit être de densité supérieure ou égale à 1.2, pour cela, le liquide de Willis peut être utilisé. C'est une solution de chlorure de sodium à saturation, obtenue par dilution de 400g de sel de cuisine dans 1 litre d'eau chaude (ou 1kg de sel pour 2.5 litres d'eau). L'ensemble doit être agité jusqu'à dissolution complète du sel.

- La technique de McMaster

En coproscopie individuelle, la technique de McMaster utilise la solution de Willis. Pour cette technique, 3g de matières fécales sont diluées dans 42ml de solution. L'ensemble doit être homogénéisé à l'aide d'un mortier, puis filtré 3 fois (une passoire à thé peut être utilisée) pour éliminer les gros débris. Une partie du liquide est ensuite prélevée à l'aide d'une pipette, pour remplir les deux chambres de la lame de McMaster, contenant chacune 0.5ml. Ces chambres sont composées d'un réseau, sur lequel se fait la lecture, et contenant quant à lui 0.15ml.

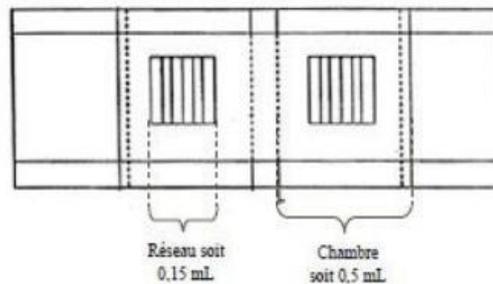


Figure 7 : Schéma d'une lame de McMaster.

Lorsque les chambres sont remplies, la lame doit rester bien horizontale, et n'est lisible qu'après 2 minutes, pour permettre aux œufs de remonter et venir sous la lamelle du réseau. A ce moment-là, la lame doit être placée sous le microscope, et observée pour le comptage au grossissement x 100 ou x 50.

Tout d'abord, les œufs contenus dans les deux réseaux sont comptabilisés, si aucun œuf n'est trouvé, le reste de la chambre est observé. En ce qui concerne les œufs comptabilisés au sein des deux réseaux : pour rappel 3g de fèces ont été dilués dans 42ml de solution de Willis, soit environ 45ml. De ces 45ml, 0.3ml remplissent les deux réseaux, ainsi, pour un œuf trouvé dans ces 0.3ml, cela correspond à 150 ($= (45 \cdot 1) / 0.3$) œufs pour les 45ml de solution. Cette solution contenant 3g de fèces, un œuf comptabilisé sur les deux réseaux correspond à 50 ($= 150 / 3$) œufs par gramme (OPG) de fèces. De la même manière, un œuf comptabilisé dans le reste de la chambre correspond à 15 OPG.

En coproscopie de mélange : elle permet un diagnostic de troupeau, là où les coproscopies individuelles entraîneraient un coût trop important pour l'éleveur. Il est recommandé de réaliser un échantillon de 15 individus au sein du troupeau, aussi représentatif que possible. A défaut, il faudra un minimum de 10 individus, afin de ne pas surestimer ou sous-estimer l'excrétion moyenne du lot (Jacquiet, Canellas et al. 2014). Les prélèvements sont une nouvelle fois mis en conditionnement individuel, 1g de chaque est prélevé, et l'ensemble est homogénéisé. De la même manière qu'en

coproscopie individuelle, 3 grammes issus du mélange sont prélevés et deux coproscopies sont réalisées selon la méthode de coproscopie individuelle.

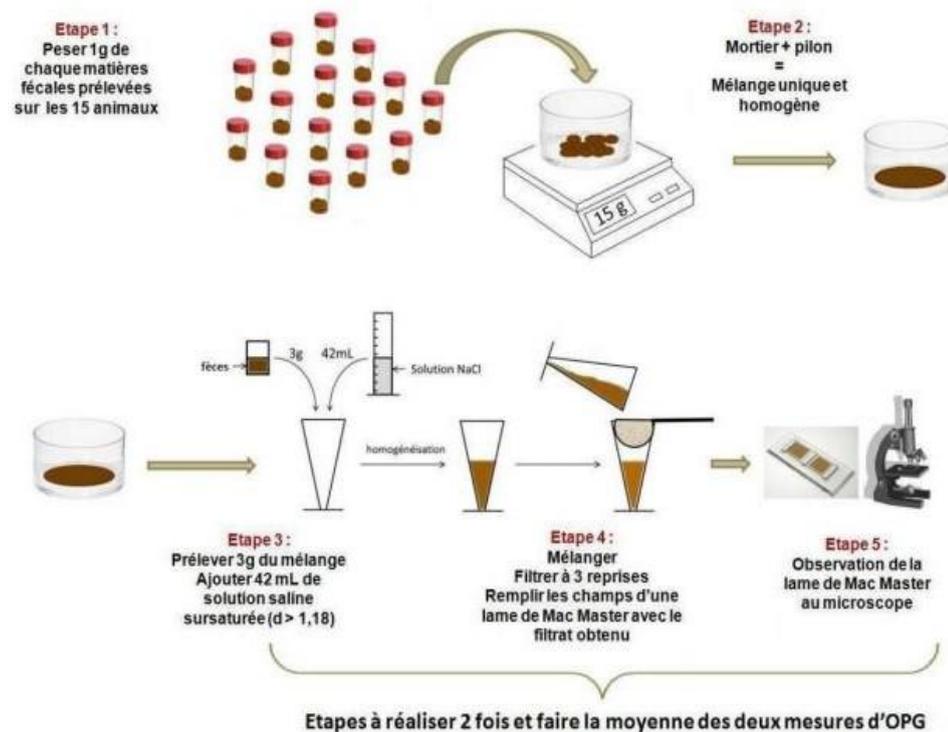


Figure 8 : Schéma de la réalisation d'une coproscopie de mélange (Jacquet, 2018).

Plusieurs études (Bonfont, Canellas, 2014 et Morgan et al., 2005) ont démontré :

- Une forte corrélation ($r = 0.98$) entre les moyennes des valeurs individuelles des 15 individus et la moyenne des deux coproscopies de mélange.
- Une forte corrélation ($r = 0.97$) entre la moyenne des valeurs individuelles des 10 individus et la moyenne des deux coproscopies de mélange.

Interprétation résultats : il n'existe pas de consensus sur des valeurs seuils précises, permettant de décider de traiter ou non. Cependant, on peut considérer (Jacquet et al, 2018):

- < 500 OPG : animal faiblement parasité, en l'absence de signes cliniques, un traitement n'est pas nécessaire
- $500 - 1000$ OPG : animal modérément parasité, la décision de traiter ou non devra prendre en compte d'autres paramètres, tel que l'état général de l'animal, la présence de signes cliniques...
- $1000 - 2000$ OPG : animal fortement parasité, nécessité de traiter même en absence de signes cliniques
- > 2000 : animal très fortement parasité, nécessité de traiter.

De plus, l'interprétation devra prendre en compte différents paramètres, tel que l'âge des individus (immunité chez les adultes), leur stade physiologique (augmentation excrétion post-partum), la prolificité de l'espèce parasitaire (*H. contortus* > *T. circumcincta* > *T. colubriformis*), et la consistance des fèces (dilution lors de diarrhées) ...

4.2.2 Mise en évidence des larves : coproculture

Le but de la coproculture est d'obtenir des larves infestantes à partir des œufs de strongles gastro-intestinaux. En effet, la diagnose de l'espèce est impossible à réaliser à partir des œufs, mais réalisable en se basant sur la morphologie des larves L3. Il existe différents protocoles, celui que nous allons décrire est celui qui a été utilisé pour notre partie expérimentale. Avant de le décrire, il est bon de savoir que, selon l'espèce de strongle gastro-intestinal, la température et l'humidité idéale pour le développement des larves varient. Ainsi, lorsque l'on souhaite le développement de plusieurs espèces de larves, il faudra trouver un compromis température/humidité (Dobson et al, 1992).

Les échantillons d'un même lot sont prélevés de la même manière que pour l'examen de coproscopie. 3 à 5 grammes de chaque échantillon individuel sont mélangés dans un pot en plastique. Par la suite, ces pots sont mis en culture en étuve, à une température de 25°C et humidifiés à l'aide d'un spray d'eau toute les 48h environ. Cette culture dure 10 jours minimum.

A l'issue de ces 10 jours, les larves sont récoltées selon la méthode MAFF (Maff, 1986). Le pot est en intégralité rempli d'eau, une boîte de pétri est apposée ouverte sur l'orifice, puis le tout est retourné. La boîte de pétri doit être ensuite remplie d'eau au 2/3 environ, et l'ensemble est mis à reposer 24h. Durant cet intervalle, les larves, attirées par la lumière, vont s'extraire des matières fécales, puis descendre par gravité jusqu'à la boîte de pétri. La récolte consiste, à l'issue des 24h, à aspirer l'eau contenue dans la boîte de pétri, et contenant les larves, à l'aide d'une pipette.

NB : afin d'augmenter le nombre de larves récupérées, il est possible, suite au retrait de l'eau de la boîte de pétri à l'issue des 24 premières heures, de remplir à nouveau cette dernière pour refaire une récolte 24h plus tard.

Le liquide ainsi récolté est placé dans un tube, qui est par la suite centrifugé pendant 10 minutes à 4500 tours. Les larves L3 se concentrent dans le culot, et le surnageant est éliminé. Le culot est ensuite observé au microscope, et l'identification est principalement basée sur l'observation de l'extrémité caudale des larves. Il existe une clé de détermination pour les principales espèces de strongles gastro-intestinaux (d'après Van Wyk, Mayhew, 2013 ; annexe 2), mais en ce qui concerne les 3 parasites auxquels nous nous intéressons, le tableau suivant peut être utilisé :

Genre	Longueur total (µm) et aspect de la queue de la gaine	Nombre et des aspects des cellules intestinales	Aspect de l'extrémité antérieure	Autres éléments morphologiques
<i>Haemonchus</i>	750-850 moyenne, pointue ; décalée	16, assez nettes		
<i>Teladorsagia</i>	700-850 courte, pointue	16, assez nettes	Carrée	Queue de la larve arrondie
<i>Trichostrongylus</i>	700 courte, pointue	16, assez nettes	Aplatie et rétrécie	Queue de la larve arrondie avec 1 ou 2 tubérosités

Tableau 2 : Eléments d'identification de larves L3 (Lefèvre et al, 2003).

Pour conclure sur cette méthode, elle est relativement simple à mettre en place, cependant elle reste longue, fastidieuse, qualitative uniquement, et nécessite un opérateur aguerri.

4.2.3 Détection de l'ADN et identification moléculaire du parasite : PCR et qPCR

Ces deux méthodes sont plus récentes que les méthodes décrites précédemment. Elles permettent de palier aux défauts de sensibilité et spécificité des autres méthodes, et sont moins chronophages et opérateurs dépendants. Cependant, elles ont un coût plus élevé.

- PCR classique

Le principe de la PCR repose sur l'amplification puis la détection de segments d'ADN spécifiques des strongles gastro-intestinaux. Ainsi, à partir d'un segment initial, plusieurs milliers de copies sont produites et peuvent être ensuite détectées, signant la présence de ces strongles gastro-intestinaux. L'amplification nécessite, au préalable, une extraction de l'ADN des larves présentes, via des kits d'extraction du commerce.

Ensuite, concernant l'amplification des segments d'ADN, ces derniers doivent dans un premier temps être dénaturés. Cette étape, qui induit la séparation des deux brins d'ADN, est indispensable pour que les amorces ; complémentaires des segments ADN des strongles gastro-intestinaux recherchés ; puissent s'hybrider de part et d'autre de la séquence cible. Enfin, une ADN polymérase va permettre l'extension de ces amorces, et donc la synthèse de nouveaux brins d'ADN, qui eux-mêmes serviront de matrice lors du prochain cycle. Il y aura ainsi, à chaque nouveau cycle, une augmentation exponentielle des segments ADN spécifiques recherchés. Un des avantages majeurs de cette technique est sa sensibilité, en effet, de par son principe, de très faibles quantités d'ADN (et donc de faibles nombres de parasites) peuvent être détectés (cf Annexe 3). Cependant, la PCR classique ne permet qu'une approche

qualitative. En effet, elle permet de détecter la présence d'une espèce de strongle, sans donner d'information sur l'intensité de l'excrétion et donc de l'infestation.

- PCR quantitative

La PCR quantitative (ou qPCR) permet quant à elle de connaître le nombre de copies d'ADN parasite initialement présentes dans l'échantillon. Ainsi, avec la qPCR, il est possible d'avoir une idée de l'intensité de l'excrétion et donc de l'infestation. Pour cela, la technique se base sur l'émission de fluorescence, dont l'intensité est proportionnelle au nombre de copies d'ADN formées. La technologie TaqMan est la plus fréquemment utilisée. Elle est basée sur une sonde TaqMan, complémentaire d'une séquence interne du segment d'ADN cible, donc entre les deux amorces d'amplification. Cette sonde porte en 5' un fluorochrome, inhibé par la présence en 3' d'un *quencher*. Lors de l'amplification, l'ADN polymérase va hydrolyser la sonde TaqMan, ce qui va permettre de libérer le fluorochrome. Ce dernier, qui n'est alors plus inhibé par le *quencher*, va pouvoir émettre une fluorescence (Heissi, Arbeituber, Tiemann-Boege, 2017), cf Annexe 4. Ainsi, la quantité de fluorescence sera proportionnelle au nombre de copies d'ADN produites, l'augmentation de fluorescence allant dans le même sens que l'augmentation des copies d'ADN. Cette fluorescence est mesurée, et une gamme étalon permet ensuite de la corrélérer avec le nombre de copies d'ADN initialement présentes, et donc avec l'intensité de l'infestation.

- Bilan

Quelle que soit la technique de PCR utilisée, il sera possible avec un seul échantillon d'identifier les genres *Haemonchus*, *Trichostrongylus* et *Teladorsagia*. Ceci est possible car le segment ADN ciblé par les amorces, le gène ITS-2, présente une forte variabilité inter-spécifique et une faible variabilité intra-spécifique. Des amorces spécifiques de ce gène ITS-2, et spécifiques de chaque genre ou espèce parasite, peuvent ainsi être produites.

Ainsi, avec la qPCR, les espèces présentes, mais également leurs proportions relatives sont accessibles. De plus, le seuil de détection passe de minimum 15 OPG en coproscopie classique, à une larve avec les méthodes PCR.

A noter donc, comme avantages des PCR en comparaison aux autres méthodes, le gain de spécificité et de sensibilité (McNally et al., 2013), de temps via l'automatisation des étapes, et enfin une meilleure répétabilité (donc une moins grande dépendance aux opérateurs, Roeber et al., 2012). Il est cependant important de noter que cette technique n'est accessible qu'en laboratoires spécialisés, et avec un coût plus élevé (Jacquiet, Canellas et al., 2014)

4.2.4 Dépistage post-mortem : l'autopsie

De nos 3 espèces d'intérêt, toutes ne sont pas facilement visibles à l'autopsie. Leur observation n'est possible qu'après ouverture et lavage des portions du tube digestif.

En ce qui concerne les parasites de la caillette, les adultes d'*H. contortus* sont les plus facilement visibles. Ils se caractérisent par leur couleur rouge, de plus leur fixation à la muqueuse peut induire petites taches hémorragiques ainsi que des ulcères.



Figure 9 : Formes adultes d'*H. contortus* à la surface d'une muqueuse d'abomasum (<http://sciencewatch.com>).

Par opposition, les adultes de *T. circumcincta* sont plus difficilement visibles. La présence de ce parasite est plutôt détectée par des nodules blanchâtres à la surface de la muqueuse, induits par le développement des larves L4 (Kerboeuf, Hubert, Hoste, 1997).

Pour les parasites de l'intestin grêle, et particulièrement *T. colubriformis*, leur présence est difficile à détecter lors d'une autopsie, il faut utiliser une loupe binoculaire pour les observer sur les produits de lavage de la muqueuse de l'intestin grêle.

5. Les méthodes de lutte chimique : utilisation des anthelminthiques en France

5.1 Benzimidazoles et dérivés

Les benzimidazoles et leurs dérivés représentent la famille de molécule anthelminthique la plus ancienne. En effet, la première molécule a été commercialisée au début des années 1960. Cette famille a un large spectre d'activité : nématodes (dont les strongles gastro-intestinaux et respiratoires) et cestodes (*Moniezia spp*). Certaines molécules de cette famille comme l'albendazole ou le netobimin sont également efficaces contre des trématodes : la grande et la petite douve (*Fasciola hepatica* et *Dicrocoelium lanceolatum*). On retrouve aussi le triclabendazole uniquement efficace contre *F. hepatica* pour les trématodes (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

Concernant les strongles gastro-intestinaux, les benzimidazoles sont ovicides, adulticides et larvicides. En effet, ils agissent en se fixant spécifiquement sur les β -tubulines, ce qui empêche leur polymérisation et donc la synthèse des microtubules cytoplasmiques. L'absence de ces microtubules induit une désorganisation des cellules tégumentaires et intestinales de l'adulte, entraînant sa mort. De plus, le fuseau mitotique étant perturbé, les cellules de l'œuf n'ont plus la capacité de se diviser, ce

qui implique également la mort de l'œuf (Köhler, 2001). En revanche, il semblerait que l'activité de cette famille soit réduite lorsque les larves sont en état d'hypobiose.

D'un point de vue pharmacocinétique et dynamique, ces molécules n'ont pas de rémanence au sein d'un individu, c'est-à-dire qu'elles ont une durée d'action brève et que l'animal peut se réinfester dès le lendemain. Ces molécules sont le plus souvent administrées per-os sous forme de suspension. Elles possèdent un index thérapeutique très large, ce qui rend les effets secondaires aux surdosages plutôt rares. Enfin, du fait de l'embryotoxicité de certaines molécules (nétabimin et albendazole à fortes posologies, soit > 10 mg/kg), leur utilisation à ces posologies est contre-indiquée dans le 1^{er} tiers de gestation (Jacquet, Fidelle, et al. 2014).

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes, L4 + hypobiose, œufs)	Strongles pulmonaires	Moniezia expansa	Fasciola hepatica (adultes)	Dicrocoelium lanceolatum (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 ^{er} agnelage, en lactation et au tarissement
Albendazole	3,8 mg/kg VO (sauf hypobiose)					Interdit dans le 1 ^{er} 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 ^{er} tiers de gestation
	20 mg/kg VO					

Tableau 3 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage des benzimidazoles en élevage ovin (Jacquet, Fidelle et al., 2014).

5.2 Imidazothiazoles et Tétrahydropyridines

En ce qui concerne les familles des Imidazothiazoles et des Tétrahydropyridines, une seule molécule par famille est utilisée en tant qu'anthelminthique : il s'agit du lévamisole pour la première et du morantel pour la seconde. Ce sont également de vieilles molécules, puisqu'elles ont commencé à être commercialisées au milieu des années 1960. Le morantel n'est, par ailleurs, plus commercialisé en France. En ce qui concerne le lévamisole, le spectre d'action est plus restreint puisqu'il n'est efficace que sur les nématodes (strongles intestinaux et respiratoires) et uniquement sur les vers adultes.

Ces molécules sont des agonistes cholinergiques agissant au niveau des synapses neuro-musculaires. En effet, elles se fixent sur les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine des canaux sodiques, présents sur les cellules musculaires post-synaptiques (Köhler 2001). Cette fixation entraîne une ouverture durable de ces canaux, induisant un flux sodique permanent, qui provoque la dépolarisation prolongée de la cellule musculaire. Cette dépolarisation correspond à un état de contraction de la cellule, et donc au niveau du parasite, à une paralysie spastique. Ce dernier est alors éliminé avec les matières fécales (Wolstenholme et al. 2004).

Concernant la pharmacocinétique et dynamique, ces molécules n'ont pas de rémanence. Elles se présentent sous forme d'administration per-os ou injectable. Elles possèdent un index thérapeutique très étroit, = la dose toxique étant très proche de la dose efficace. Les cas d'intoxications, pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal peuvent s'avérer relativement fréquents (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes)	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 ^{er} agnelage, en lactation et au tarissement

Tableau 4 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage du lévamisole en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).

5.3 Salicylanilides

Le closantel et le nitroxinil sont deux molécules ayant un effet anthelminthique de la famille des salicylanilides. Elles ont un spectre d'action très restreint, puisqu'elles sont efficaces contre *F. hepatica*, et les nématodes hématophages (*H. contortus*). Le closantel a également une action contre les larves L1 à L3 d'*Oestrus ovis* (larves de diptères parasitant les cavités nasales des ovins). Ces molécules se fixent très fortement et de manière durable sur les protéines plasmatiques (l'albumine essentiellement), et ont une distribution tissulaire assez faible (Veillet, 2001).

Elles agissent en découplant la phosphorylation oxydative au sein des mitochondries des parasites, puisqu'elles perturbent le gradient de proton H⁺ présent entre les compartiments de ces dernières. En altérant le fonctionnement des mitochondries, elles empêchent la synthèse d'ATP et donc la synthèse d'énergie pour le parasite. Ce dernier épuise ses réserves puis meurt (Köhler, 2001).

Ces molécules se présentent sous forme injectable ou en administration per-os. Elles sont souvent associées à d'autres familles d'anthelminthiques afin de compléter leur spectre d'action restreint, notamment pour les strongles non-hématophages (Jacquiet, Fidelle, et al. 2014). En revanche, le fait qu'elles puissent se fixer durablement sur les protéines plasmatiques implique une rémanence d'environ 5

semaines contre les strongles hématophages. Son index thérapeutique est assez large, les effets toxiques se produisent quand on atteint environ 4 fois la dose recommandée (Veillet 2001).

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 ^{er} 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			

Tableau 5 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage des salicylanilidés en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).

5.4 Lactones macrocycliques

Les lactones macrocycliques sont divisées en deux classes : les avermectines regroupant l'éprinomectine, la doramectine, et l'ivermectine d'une part, et les mylbémeycines comprenant la moxidectine d'autre part. Cette famille est assez ancienne, puisqu'elle a été commercialisée à partir du début des années 1980. Elle a un spectre d'action assez large, comprenant les nématodes gastro-intestinaux, à tous les stades y compris les larves en hypobiose. Elles sont aussi efficaces contre des ectoparasites, notamment les insectes et les acariens. En revanche, elles n'ont pas d'action contre les cestodes et les trématodes.

Ces molécules agissent en se fixant sur les récepteurs au glutamate des canaux Cl⁻, que l'on retrouve au niveau de la synapse neuromusculaire chez les nématodes et les arthropodes. Cette fixation entraîne une ouverture durable de ces canaux, et donc une entrée massive d'ions chlorure dans la cellule. Cette dernière entre dans un état d'hyperpolarisation. Ainsi, la cellule musculaire ne pouvant plus se dépolariser et donc se contracter, une paralysie flasque empêche le parasite de s'alimenter normalement (Köhler, 2001). Ces molécules sont également capables de se fixer sur les récepteurs au Cl⁻ sensibles au GABA.

Il existe de nombreuses formes galéniques : injectable, Pour-on ou voie orale ; le choix du mode d'administration aura un impact sur le spectre d'activité. En effet, les formes injectables et certains Pour-on vont inclure les arthropodes, à l'inverse des

formulations orales. Les lactones macrocycliques ont des propriétés lipophiles, qui leur permettent une rémanence de 2 à 5 semaines, par stockage dans le tissu adipeux puis relargage progressif. Certaines formulations de moxidectine en injectable ont même une rémanence de 4 mois (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

Les mammifères n'ont pas de canaux Cl⁻ sensibles au glutamate, et ceux sensibles au GABA se situent dans le système nerveux central, ils sont donc protégés par la barrière hémato-méningée. Cela implique une toxicité faible, et donc un index thérapeutique large. Cette toxicité n'est en revanche pas la même pour certaines races de chiens comme les Colleys, Berger Australien et apparentés, qui possèdent une mutation sur le gène MDR-1 rendant la barrière hémato-méningée perméable aux lactones macrocycliques notamment. Cette mutation n'est cependant pas décrite chez les ovins. Enfin ces molécules, à l'exception de l'éprinomectine, ne peuvent pas être utilisées chez les femelles laitières en lactation.

Molécules	Strongles gastro-intestinaux (adultes et L4 + hypobiose)	Strongles pulmonaires (adultes et larves)	Oestrus ovis	Moniezia expansa	Fasciola hepatica	Dicrocoelium lanceolatum	Restriction d'usage/femelles laitières
Ivermectine	0,2 mg/kg VO						Interdit 28 jours avant le 1 ^{er} 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 ^{er} agnelage, en lactation et au tarissement
Doramectine	0,2 mg/kg IM (+ <i>Psoroptes ovis</i>)						interdit 70 jours avant le 1 ^{er} 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

Tableau 6 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage des lactones macrocycliques en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).

5.5 Dérivés d'aminocétonitrile

Cette famille d'anthelminthique ne comporte pour l'instant qu'une seule molécule, le monépantel. Il s'agit de la famille la plus récente puisqu'elle a été

commercialisée à partir de 2009. Elle a un spectre d'action ciblé sur tous les stades des nématodes gastro-intestinaux, y compris les larves en hypobiose. Cette famille est surtout présentée comme une solution de traitement pour les parasites multi-résistants aux autres familles, apparus ces dernières années (Kaminsky et al. 2008).

Le mode d'action du monépantel est voisin de celui du lévamisole, il s'agit d'un agoniste cholinergique des synapses neuromusculaires des nématodes. Cependant, le monépantel cible une sous unité particulière du récepteur nicotinique sensible à l'acétylcholine, la sous unité DEG-3 qui est spécifique des nématodes. De même que pour le lévamisole, cette fixation entraîne une paralysie spastique (Taylor *et al.*, 2016).

Etant donné que le monépantel cible une sous unité spécifique aux nématodes, la toxicité de cette molécule pour les mammifères est quasi nulle. Elle existe sous forme de suspension buvable et ne semble pas avoir de rémanence. Enfin elle est interdite chez les femelles laitières à n'importe quel stade.

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					Interdit chez les brebis laitières en lactation à tout stade

Tableau 7 : Spectre d'action, posologie et restriction d'usage du monépantel en élevage ovin (Jacquiet, Fidelle et al., 2014).

**PARTIE 2 : LA RESISTANCE DES STRONGLES
GASTRO-INTESTINAUX DES OVINS AUX
ANTHELMINTHIQUES CHIMIQUES**

1. Introduction et définition des résistances aux anthelminthiques

De nos jours, les résistances aux anthelminthiques concernent toutes les familles de molécules existantes, et sont présentes dans quasiment tous les pays où l'élevage ovin est présent. Elles ont des répercussions économiques conséquentes, et, dans certains pays comme la Nouvelle-Zélande, leur sévérité est telle que la pérennité de la filière est menacée (Wolstenholme et al. 2004).

Ces résistances font suite à l'utilisation massive, durant plusieurs décennies, de différentes familles d'anthelminthiques pour la gestion des parasitoses ovines. En effet, ce sont ces utilisations massives qui induisent la sélection des individus résistants, au sein des populations de strongles gastro-intestinaux.

Les résistances parasitaires se définissent comme : **la capacité héritable d'un parasite à survivre à une dose d'anthelminthique normalement efficace** (Abbot, Taylor, Stubbings, 2012).

Ces résistances passent par l'acquisition d'allèles mutés au sein du génome des parasites, conférant ainsi des résistances à des familles d'antiparasitaires. Cette acquisition se fait par des phénomènes de mutations aléatoires, qui surviennent même en l'absence d'exposition aux molécules antiparasitaires. Ainsi, dans une population n'ayant jamais été exposée à un anthelminthique, il est possible d'observer des parasites présentant des allèles mutés, conférant une résistance aux traitements chimiques. Cependant, en l'absence de pression de sélection, induite par les traitements anthelminthiques, ces allèles ne confèrent aucun avantage pour les strongles les portant. De plus, dans certains cas, ces allèles mutés peuvent même conférer un désavantage. C'est pour cela qu'en l'absence de pression de sélection, ces allèles mutés, conférant une résistance aux antiparasitaires, ne se disséminent pas au sein de la population et gardent une fréquence faible. Il est également important de noter que ces allèles sont, pour la majorité, récessifs. Il faut ainsi que les deux copies du gène soient mutées, afin que le parasite acquière des capacités de résistance (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

Lorsque des traitements antiparasitaires sont effectués, ces derniers agissent en exerçant une pression de sélection sur les parasites. En effet, lors des traitements, la majorité des individus sensibles sont éliminés, mais ce ne sera pas le cas pour les individus résistants, présentant les deux allèles mutés. Ces derniers survivent et se multiplient à une fréquence plus élevée que les parasites sensibles restant. La résistance se dissémine alors au sein de la nouvelle population parasitaire, puisque les parasites résistants distribuent leurs allèles mutés à leur descendance (Jacquie, Fidelle, et al. 2014). Par la suite, chaque nouveau traitement antiparasitaire induira une nouvelle pression de sélection, permettant la dissémination des allèles résistants.

En pratique, ces résistances deviennent cliniquement visibles, par perte d'efficacité des molécules anthelminthiques, lorsque 20% des parasites présents sont homozygotes résistants (présentent les deux allèles mutés). De plus, ces résistances sont diagnostiquées via les tests de laboratoire, lorsque l'administration d'un antiparasitaire entraîne une diminution de la charge parasitaire inférieure à 95%. A ce

niveau-là, cela représente au minimum 25% de parasites porteurs d'allèles mutés (Paraud et al, 2014).

Bien qu'inévitable, l'apparition de résistances doit cependant être détectée le plus tôt possible, pour endiguer leurs disséminations au sein des populations parasitaires.

2. Prévalence des résistances en France et dans le monde

2.1 En France

En France, avant les années 2010, les études portant sur les résistances aux anthelminthiques dans les élevages de petits ruminants étaient assez rares. Cependant, celles publiées montraient déjà une forte prévalence de résistances aux benzimidazoles (BZ) dans les départements des Deux Sèvres (83% des élevages étudiés), ainsi qu'au lévamisole (LEV) dans une moindre mesure. En revanche, aucune résistance aux lactones macrocycliques (LM) n'avait été décrite (Chartier et al., 1998). Le constat était le même dans le Val de Loire et le Limousin (Kerboeuf et al., 1988 ; Hubert et al., 1992).

En 2011 et 2012, des études similaires ont été menées en Aveyron et dans les Pyrénées Atlantiques, amenant à la même conclusion, une résistance quasiment généralisée aux BZ sans résistance aux lactones macrocycliques (Geurden et al., 2014). En 2014, un premier cas de résistance aux LM, tant à l'ivermectine qu'à la moxidectine, a été décrit dans un élevage ovin allaitant du département de la Loire (Paraud et al., 2014).

Depuis, plusieurs études dans le Sud-Ouest, entre 2016 et 2019 (dirigées notamment par l'UMT Santé des Petits Ruminants de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse), ont mis en évidence des résistances aux LM et même des cas de multi-résistance (parasites capables de résister à plusieurs familles d'anthelminthiques). C'est le cas par exemple en Haute-Vienne, où un élevage de petits ruminants présente une espèce de *T. circumcincta* résistante aux BZ, LV et à la moxidectine (Bordes et al, 2020), réduisant considérablement l'arsenal thérapeutique disponible. D'autres cas de multi-résistances ont été détectés dans les Pyrénées Atlantiques, les Hautes-Pyrénées ou encore en Corrèze (cf Tableau 8).

Ainsi, les résistances aux BZ et aux LV semblent bien installées en France, notamment car il s'agit des premières familles d'anthelminthiques utilisées. C'est ainsi que les BZ deviennent quasiment obsolètes pour le traitement des strongyloses gastro-intestinales. Les LM semblent suivre la même voie, avec une multiplication des cas décrits ces dernières années. Les résistances aux anthelminthiques deviennent donc un problème majeur pour la filière ovine en France.

Localisation	Molécule testé	Suspicion de résistance (nombre de suspicion/nombre total d'élevages testés)	Référence
Val de Loire	BZ ; LEV	BZ : 2/18 LEV : 1/18	Kerboeuf et al., 1988)
Limousin	BZ	10/20	Hubert et al., 1992)
Deux-Sèvres (79)	BZ ; LEV ; LM	BZ : 19/23 LEV : 9/18	Chartier et al., 1998)
Aveyron (12)	BZ	5/5	Geurden et al., 2014)
Pyrénées-Atlantiques (64)	BZ	5/5	Geurden et al., 2014)
	BZ ; LEV ; LM	BZ +LM (doramectine) : 1/1 LEV : 0/1	(Bordes et al, 2020)
Loire (42)	LM	LM : 1/1	(Paraud et al., 2014)
Corrèze (19)	BZ ; LM	BZ : 3/4 BZ + LM : 1/4	Milhes et al., 2017)
Hautes-Pyrénées (65)	BZ ; LM	BZ + LM : 1/1	(Cazajous et al., 2018)
Haute-Vienne (87)	BZ ; LEV ; LM ; closantel ; monepantel	BZ : 7/7 BZ + LEV : 5/7 BZ + LEV + LM : 1/7	(Richelme et Greil, 2019 ; Bordes et al., 2020)

Tableau 8 : Fréquence de la résistance des SGI dans les élevages ovins en France selon la région et le type d'anthelminthique (adapté de Bordes et al.,2020 et Richelme and Greil, 2019).

2.2 Dans le reste du monde

2.2.1 A l'échelle de l'Europe

La France n'est pas le seul pays en Europe atteint par des cas de résistances aux anthelminthiques dans les élevages ovins. En effet, des cas ont été décrits dans plusieurs pays comme le Royaume-Uni, l'Espagne, la Grèce, en Italie... Une étude conduite en 2014 a ainsi montré une forte prévalence des résistances aux BZ et au LEV en Italie et en Grèce. De plus, des cas de multi résistances ont été mis en évidence, incluant les LM, en Grèce (Geurden et al., 2014). Le Royaume-Uni n'est pas en reste, puisque des cas de multi-résistances à au moins 3 familles d'anthelminthiques ont été détectés (Abbott et al., 2012).

La situation est encore plus inquiétante aux Pays-Bas, avec une accélération des cas de résistances. Avant 2007, aucun cas n'était décrit concernant une autre famille que les BZ. Depuis, des cas de résistances aux LM sont régulièrement dépistés, comme le montre les études de Borgsteede et al. en 2007 et 2010, et celle de Van den Brom et al. en 2013, mais également au monépanel (Van den Brom et al, 2015). Enfin, une étude menée en 2018 montre une prévalence de près d'un élevage sur deux, ayant une multi résistance à au moins 2 familles de molécules. Il semblerait que *H. contortus* soit l'espèce la plus impliquée dans ces cas de multirésistance (Ploeger, Everts, 2018).

2.2.2 A l'échelle du monde

A l'échelle de la planète, la situation est similaire, voir plus inquiétante encore qu'en Europe. Les résistances concernent majoritairement les 3 espèces que l'on retrouve en France, à savoir *H. contortus*, *T. circumcincta*, et *T. colubriformis*. L'apparition de ces résistances est rapide, des cas sont décrits en moyenne 7 ans après la commercialisation d'une nouvelle molécule. Toutes les régions du monde sont concernées, notamment les pays ayant une forte production ovine comme la Nouvelle-Zélande, l'Australie ou encore l'Afrique du Sud. Dans ces pays-là, dès les années 90, 85% des élevages environ présentaient déjà une résistance aux BZ et au LEV (Overend et al., 1994). Depuis, on assiste à une généralisation des cas de multi-résistances, incluant les LM et le monépanel, pour lequel les premiers cas de résistances ont été démontrés 3 ans à peine après sa commercialisation.

Concernant l'Amérique du Sud, des études menées au Brésil ont montré une prévalence très forte puisque, dans la région frontalière avec l'Uruguay, 97% des élevages présentaient au moins une résistance à une famille d'anthelminthiques. Une étude, menée en 2017, a mis en évidence que la moitié des élevages étudiés présentaient une multirésistance, à au moins 3 familles dont certaines au monépanel (Cintra et al., 2016 ; De Oliveira et al., 2017).

Famille d'anthelminthique	Molécule	Commercialisation	Premiers cas de résistance	Pays
Benzimidazoles	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
Salicylanilides	Closantel	1977-1981	1982	Afrique du Sud
Imidazothiazoles	Lévamisole	1965	1981	Australie
Lactones macrocycliques	Ivermectine	1981	1987	Afrique du Sud
	Abamectine	1985	2001	Australie
	Moxidectine	1992	2001	Nouvelle-Zélande
	Doramectine	1993	2001	Etats-Unis
	Eprinomectine	1996	2009	Suisse
Dérivés d'acétonitrile	Monepanel	2009-2010	2013	Nouvelle-Zélande

Tableau 9 : Historique de l'apparition de résistances en élevage ovine dans le monde (Kotze, Prichard, 2016).

3. Mécanismes de chimiorésistance

3.1 Mécanismes non-spécifiques

Les mécanismes non-spécifiques de résistances impliquent que les anthelminthiques sont éliminés avant d'atteindre leur site d'action. Plusieurs mécanismes peuvent en être responsables, n'expliquant pas nécessairement l'ensemble des résistances observées (Jacquiet et al. 2014) :

- La surexpression de certaines P-glycoprotéines (P-gp), dont le rôle dans le tube digestif ou la cuticule du ver est d'agir en tant que pompe à efflux envers les molécules anthelminthiques. Ce premier mécanisme pourrait avoir un rôle fondamental dans la résistance aux lactones macrocycliques. En effet, il a été observé (Demeler et al. 2013 ; Kotze, Prichard. 2016) que lorsque l'expression de cette P-glycoprotéine est diminuée, ou que cette dernière est inhibée (avec le vérapamil par exemple), les strongles résistants sont dès lors éliminés.
- La détoxification de l'anthelminthique via le cytochrome P450
- La modification structurale des neurones sensoriels. En effet, il a été démontré que des haplotypes différents pour certains gènes, comme le gène *dyf-7*, conféraient une résistance à certains anthelminthiques. Ces gènes sont associés au développement des neurones sensoriels, et leurs mutations entraîneraient une réduction de l'exposition de ces derniers aux molécules anthelminthiques. (Urdaneta-Marquez et al, 2014)

3.2 Mécanismes spécifiques

Cette fois, ce sont sur les cibles des molécules anthelminthiques qui portent les mutations. Ainsi, les interactions entre la molécule anthelminthique et son récepteur ne sont plus efficaces. De fait, lorsqu'un parasite devient résistant à une molécule anthelminthique, il l'est également à toutes les autres molécules de la même famille (ayant le même mécanisme d'action).

Au sein d'une population, il est possible que certains individus deviennent résistants à plusieurs familles d'antiparasitaires, c'est la multirésistance. Elle s'acquiert avec le temps, lorsque le parasite subit plusieurs mutations conférant des résistances, sur les allèles de différents gènes. Il faut être conscient qu'un défaut d'efficacité de plusieurs familles anthelminthiques dans un élevage peut être dû soit à la présence d'une espèce parasite multirésistante, soit à la présence de plusieurs espèces parasites, chacune étant résistante à une famille d'anthelminthique différente.

3.2.1 *Résistance aux Benzimidazoles (BZ)*

C'est une mutation sur le gène de la β -tubuline, cible des BZ, qui est responsable d'une perte d'affinité entre la molécule anthelminthique et sa cible. La première mutation observée, conférant une résistance aux BZ, se situe au niveau du codon 200 de l'isotype 1 de la β -tubuline (substitution d'une phénylalanine par une tyrosine, Köhler 2001). Chez *H. contortus*, cette mutation responsable de la résistance est récessive, les individus résistants sont donc homozygotes mutants. Cependant, chez certains individus résistants, cette substitution du codon 200 est absente. Le

phénomène de résistance peut alors être attribué à deux autres polymorphismes, soit en position 198 (Ghisi et al. 2007) soit en position 167. Enfin, en ce qui concerne les polymorphismes des positions 200 et 167, ces derniers peuvent également être observés sur l'isotype 2 de la β -tubuline, sans que l'importance de cet isotype ne soit réellement connue.

Ces mutations seraient également présentes chez *T. colubriformis* et *T. circumcincta*. De la même manière que pour *H. contortus*, l'homozygotie de mutation des codons 200 ou 198 est nécessaire pour conférer une résistance. Cependant, pour *T. circumcincta*, l'homozygotie n'est plus nécessaire pour la mutation du codon 167. L'hétérozygotie pour la mutation du codon 167 est alors suffisante, à elle seule, pour induire une résistance aux BZ, elle est donc dominante (Silvestre, Cabaret, 2002).

Ainsi, les mécanismes génétiques conférents des caractères de résistances aux BZ sont en partie différents entre les différentes espèces de parasites.

3.2.2 Résistance aux Imidazothiazoles

Les mécanismes de résistances au lévamisole concernent plusieurs gènes. En effet, il a été prouvé que la mutation des gènes *Hco-unc-63* et *Hco-acr-8* entraînent la formation de protéines qui se lient aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Ils empêchent ainsi le lévamisole de se fixer sur ces récepteurs. Concernant le gène *Hco-unc-63*, il semble que seuls les individus hétérozygotes possèdent la résistance. Pour le gène *Hco-acr-8*, la délétion d'une séquence précise de 63 paires de base entraîne la modification d'une sous-unité du récepteur nicotinique, et donc l'apparition de la résistance. La diminution d'expression d'autres gènes, comme *Hco-unc-29*, codant également pour les récepteurs nicotiques, entraîne l'apparition d'une résistance au lévamisole. En somme, il existe plusieurs possibilités pour générer une résistance au lévamisole, bien que les mécanismes reposent tous sur une diminution de la sensibilité des récepteurs nicotiques à cette molécule (Arsenopoulos et al, 2021)

3.2.3 Résistance aux Lactones Macrocycliques

Actuellement, les mécanismes spécifiques induisant des résistances aux lactones macrocycliques ne sont pas bien connus. Plusieurs gènes ont notamment été séquencés, puis comparés mais aucune mutation majeure responsable de la résistance, en particulier chez *H. contortus*, n'a été mise en évidence (Laing, Kirsty et al. 2016 et Luo et al.2017). Une origine polygénique de ces résistances n'est donc pas à exclure.

De plus, les mécanismes non spécifiques sembleraient jouer un rôle non négligeable dans ces phénomènes de résistance. Les pompes d'efflux P-gp, impliquées dans des phénomènes de résistances à d'autres familles d'anthelminthiques, participeraient également aux résistances aux lactones macrocycliques. En effet, la sélection de certains variants alléliques de P-gp 9 chez des individus *T. circumcincta* résistants aux lactones macrocycliques a été observée, diminuant le polymorphisme présent dans la population « sensible » (Turnbull,

Jonsson et al. 2018). De plus, l'ajout d'inhibiteurs de ces P-gp entraîne une réversion de la résistance (Kotze, Prichard, 2016).

3.2.4 *Résistance aux Salicylanilides*

Le mécanisme de résistance concernant cette famille est à ce jour très mal connu.

3.2.5 *Résistance aux dérivés d'amino-acétonitriles*

Lors du développement de cette famille d'anthelminthique, des individus résistants d'*H. contortus* ont volontairement été sélectionnés en laboratoire, dans le but d'anticiper de futures résistances. Le gène muté, responsable de la résistance, code pour une sous unité du récepteur à l'acétylcholine, et se nomme Hco-mptl-1.

Dans les populations sauvages de parasites, au sein des élevages, les premières résistances ont été détectées en 2014 (Mederos et al. 2014). Bien que le mécanisme soit mal connu, chez *H. contortus*, des mutations SNP (anomalie de la structure de primaire du récepteur, protéine tronquée...) ont été observées sur le gène Hco-mptl-1, limitant la fixation du monépantel. L'apparition des résistances a été très rapide, de plus, des séquences géniques de type sauvages ont été observées chez des parasites résistants. Ce dernier point suggère que les individus résistants pourraient être hétérozygotes, et donc que cette mutation serait dominante, expliquant ainsi sa rapide propagation.

4. Facteurs favorisant l'apparition de résistances et leurs transmissions

Une résistance est liée à une mutation génétique qui se répand dans une population de parasites autrefois sensible. Il existe de nombreux facteurs facilitant l'apparition et la diffusion plus ou moins rapide des résistances au sein d'une population de parasites. Ces facteurs peuvent être regroupés en deux grandes catégories : ceux qui dépendent des parasites eux-mêmes et ceux qui dépendent de la manière dont est conduit le troupeau.

4.1 *Facteurs biologiques et génétiques*

4.1.1 *Facteurs biologiques*

Le cycle du parasite est un facteur favorisant la transmission d'une résistance au sein d'une population. En effet, lorsque les conditions environnementales sont adéquates, le cycle peut se dérouler plus rapidement et donc permettre une diffusion plus rapide des allèles de résistances. De plus, dans de bonnes conditions environnementales, il n'y a pas de larves en hypobiose, pouvant ralentir le cycle. En effet elles sont en pause dans le déroulement du cycle, ce qui implique un arrêt de la transmission des allèles de résistances (Wolstenholme et al., 2004). Enfin, l'absence d'hôtes intermédiaires, comme c'est le cas ici, favorise la transmission d'une résistance. En effet, un cycle monoxène limite les possibilités de populations refuges,

au sein d'hôtes intermédiaires, qui pourraient diluer les allèles de résistance au sein de la population parasitaire.

La prolificité du parasite joue également un rôle dans la diffusion d'une résistance. Plus un individu résistant se reproduit, plus sa descendance est nombreuse pour transmettre à son tour les gènes de résistance. C'est le cas notamment pour *H. contortus*, dont la femelle est capable de produire près de 5000 œufs par jour.

Enfin, la pathogénicité du parasite est aussi à prendre en compte. En effet, lorsqu'un parasite est très pathogène, on observe plus facilement l'apparition de signes cliniques et donc une fréquence de traitement élevée. Cette pression de sélection accrue permet la sélection plus rapide des parasites résistants d'une population. Là encore, ce mécanisme concerne surtout *H. contortus* qui est le plus pathogène des SGI des ovins.

4.1.2 *Facteurs génétiques*

Ces facteurs de diffusion et d'apparition peuvent tout d'abord concerner les gènes de résistances eux-mêmes. En effet, si le caractère de résistance s'obtient par la mutation de plusieurs gènes, alors la probabilité d'apparition de résistances est réduite dans une population, en comparaison à une résistance « monogénique » (Cabaret, 2012).

La diffusion d'une résistance dépend aussi de la dominance des allèles de résistances : si l'allèle de résistance est récessif, comme pour les BZ, alors seuls les individus homozygotes pourront exprimer ce phénotype de résistances (Cabaret, 2012). En revanche, pour des allèles de résistance dominants, une diffusion moins importante suffit pour que la résistance s'exprime. En effet, la probabilité d'avoir des individus hétérozygotes est plus importante que d'avoir des individus homozygotes. Ainsi, au sein d'une population, une résistance se verra plus rapidement si seulement un seul allèle doit porter la résistance et non les deux.

4.2 Conduite d'élevage

4.2.1 *Fréquence des traitements*

La fréquence de traitement est un des facteurs les plus importants dans l'apparition d'une résistance au sein d'une population parasitaire. Des études ont démontré une corrélation entre la fréquence de traitements et l'intensité d'une résistance (Barton, 1983 ; Falzon et al., 2015). En effet, plus il y a de traitements, notamment avec la même famille de molécule, plus la pression de sélection sur les parasites est forte. Cette pression de sélection permet uniquement la survie des individus possédant les gènes de résistances. Ces derniers vont donc pouvoir se reproduire, et ainsi ancrer ces gènes de résistances au sein d'une population.

Cette pression est maximale en cas de traitements toutes les 3 semaines (préconisés dans certains schémas thérapeutiques pour assainir les pâtures), correspondant à la période prépatente des SGI. Lors de ces traitements toutes les 3 semaines, tous les cycles de reproduction se retrouvent sous la pression d'un traitement, et donc seuls les individus résistants continuent leur reproduction, et

l'excrétion des oeufs. Ainsi, la population parasitaire de la pâture est une population composée de larves L3 exclusivement résistantes (Torres-Acosta, Hoste 2008).

4.2.2 Dosage des traitements

Les mauvais dosages lors d'un traitement (sur ou sous dosages) sont relativement fréquents dans les élevages. En effet il peut y avoir plusieurs sources d'erreurs comme l'estimation du poids des animaux, le calcul de la dose à administrer... Ces erreurs ont un impact sur l'apparition et surtout la dissémination de résistances, notamment en cas de sous dosage. En effet, si un animal reçoit une dose plus faible que celle qui est préconisée, alors il y a survie des individus hétérozygotes et élimination uniquement des individus homozygotes sensibles. Cette survie d'individus hétérozygotes a pour conséquence une augmentation de la prévalence de l'allèle de résistance au sein de la population, et donc la dissémination facilitée de celle-ci (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

Cependant, cette hypothèse est remise en question par certains auteurs. Pour ces derniers, en cas de résistance monogénique avec un allèle de résistance récessif, comme c'est le cas pour les résistances aux BZ, les individus hétérozygotes n'ont aucune résistance particulière et sont éliminés au même titre que les individus sensibles lors d'un sous-dosage. En revanche, le sous dosage aurait un impact lors de résistance polygénique comme c'est le cas pour les LM puisque dans ce cas, il pourrait y avoir survie des individus ayant seulement une partie des allèles de résistance. (Cabaret 2012).

4.2.3 Rémanence des molécules

Certaines formulations, comme des injections de moxidectine longue-action ou des dispositifs intra-ruminaux, ont été pensés pour avoir une rémanence de plusieurs semaines voire plusieurs mois chez les ovins. Leur utilisation est un facteur de risque dans l'apparition de résistances puisqu'ils entraînent une pression de sélection constante, sélectionnant ainsi les individus homozygotes résistants. De plus, sur la fin de l'efficacité de ces dispositifs, il y a une diminution des doses d'anthelminthiques, ce qui revient à un sous-dosage et donc aux conséquences décrites précédemment (I. A. Sutherland, Scott, 2010).

4.2.4 Introduction de nouveaux animaux

Lorsqu'un éleveur achète un nouvel animal pour l'introduire dans son troupeau, il acquiert également les parasites présents dans cet animal. Certains individus peuvent être porteurs de divers parasites résistants, ce qui introduit cette résistance au sein d'un élevage. C'est pourquoi il est recommandé de réaliser une quarantaine à chaque achat d'animal et traiter ces animaux, afin d'éviter ainsi qu'ils ne contaminent les pâtures avec des parasites potentiellement résistants. On peut utiliser un traitement avec une molécule jamais utilisée dans l'élevage d'origine ou, selon certains auteurs, utiliser une combinaison de plusieurs molécules. Une fois le traitement réalisé, il faut attendre 48h avant de mettre l'individu sur les pâtures. Cette durée correspond à une élimination de 99% des œufs suite à un traitement. Cette quarantaine est d'autant plus

efficace qu'une résistance est présente sur un territoire, comme c'est le cas pour les BZ en Europe (Jacquet, 2015).

4.2.5 Traitements non sélectifs - systématiques

Traiter systématiquement tous les individus d'un troupeau en même temps est une pratique assez courante dans les élevages, pourtant c'est un facteur de risque de résistance. En effet, à ce moment-là, la totalité des parasites sensibles sont éliminés, or ce sont eux à pouvoir diluer les allèles de résistances avec leurs allèles sensibles.

En outre, lorsqu'on cherche à traiter contre d'autres espèces de parasites comme les douves (*F. hepatica*, *D. lanceolatum*) ou la gale (*P. ovis*), ce sont souvent les mêmes familles de molécules que pour les strongles digestifs qui sont utilisées. Cela rajoute un traitement et donc augmente la pression de sélection sur les strongles (Torres-Acosta, Hoste, 2008)

5. Mise en évidence d'une résistance

5.1 Tests in vivo

5.1.1 FECRT ou test de réduction de l'excrétion fécale post-traitement

Ce test a l'avantage d'être relativement simple à mettre en place directement dans l'élevage, en se basant sur la réduction de l'intensité d'excrétion fécale d'œufs après un traitement. Il peut concerner toutes les familles d'anthelminthiques, ainsi que toutes les espèces de strongles digestifs d'intérêt. Il permet de comparer l'excrétion fécale d'œufs par les brebis avant et après traitement, en incluant un lot contrôle n'ayant pas reçu de traitement. Le résultat s'exprime en pourcentage de réduction de l'excrétion d'œufs post-traitement, et donne une idée globale des résistances présentes au sein de l'élevage, vis-à-vis des familles d'antiparasitaires testées.

Mise en œuvre : pour être interprétable, elle doit suivre les recommandations de la WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) (Coles et al., 2006) :

- Les lots doivent être constitués d'un minimum de 10 animaux, 15 dans l'idéal, choisis aléatoirement.
- Les animaux doivent avoir pâturé sur les mêmes parcelles pendant une période au moins équivalente à la période prépatente des strongles recherchés. De plus, les animaux ne doivent pas avoir été traités depuis au moins 3 mois.
- Avant traitement, les excréments fécaux individuels doivent être de minimum 150 OPG.
- 3 à 5g de matières fécales sont prélevées pour chaque animal, directement dans le rectum. Le prélèvement est ensuite identifié et conditionné individuellement.
- Les prélèvements doivent être analysés aussi rapidement que possible, par la technique de McMaster. En attendant, ils peuvent être conservés à 4°C, mais maximum 24 heures si des coprocultures sont réalisées par la suite.

- Les animaux des lots à traiter reçoivent l'anthelminthique à tester, en se basant sur le poids de l'animal le plus lourd, et à la dose préconisée par le fabricant. L'administration se fait à l'aide d'une seringue, par voie orale.
- Les animaux sont prélevés une seconde fois, après un délai qui dépend de l'anthelminthique testé. Par exemple, le second prélèvement se fait 3 à 7 jours après le traitement pour le LV, 8 à 10 jours post traitement pour les BZ et 14 à 17 jours post traitement pour les LM. Si plusieurs familles d'anthelminthiques sont testées sur un même lot, le second prélèvement peut s'effectuer raisonnablement 14 jours après le traitement (Jacquiet, Fidelle et al. 2014).

Remarque : le délai entre les deux prélèvements prend en compte l'inhibition de ponte temporaire qui fait suite au traitement, et dont la durée varie selon les anthelminthiques. Ne pas prendre en compte cette inhibition peut être à l'origine de faux négatifs.

Calcul du FECR :

Plusieurs méthodes de calcul sont disponibles, en 2006, McKenna n'avait pas mis en évidence de différences significatives avec les 3 méthodes de calcul, sur 210 FECRT. Cependant, en 2015, Falzon et al. ont mené une étude, portant sur 47 élevages. Ils ont relevé des différences sur le statut de résistance des élevages, selon la formule utilisée.

La première formule prend en compte le lot contrôle (C1 le lot contrôle à J0 et C2 le lot contrôle à J14) et le lot testé (T1 le lot testé avant traitement à J0 et T2 le lot testé à J14) :

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

La moyenne utilisée pour les lots contrôle et témoin peut être la moyenne géométrique ou la moyenne arithmétique. D'après certaines publications, la moyenne arithmétique fournirait de meilleures estimations sans biais (Coles et al. 1992 ; Dobson et al. 2009). Pour d'autres, la moyenne géométrique serait plus appropriée car l'excrétion n'est pas constante et dépend davantage du caractère sur-dispersé du parasite dans le cheptel (Smothers et al, 1999). Pour certains, cette formule serait à favoriser. En effet l'inclusion du lot contrôle et testé avant et après traitement rend l'estimation de l'efficacité de l'anthelminthique plus fiable, par la prise en compte des variations temporelles d'excrétion d'œufs par les ovins (Falzon et al, 2015).

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

Cette formule prend en compte le lot témoin et testé après le traitement (Coles et al. 1992). Suite à l'étude basée sur les 47 élevages, cette formule serait à privilégier, en particulier lorsque les niveaux de résistance sont faibles. Elle permettrait de minimiser le travail et les coûts liés au test.

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

Enfin, cette dernière formule ne prend en compte que les lots testés, réduisant les échantillons à prélever et analyser puisqu'elle ne prend pas en compte les lots témoins (McKenna, 2006).

Interprétation du test :

Suite au calcul du FECR, et selon les recommandations de la WAAVP, il y a 3 cas possibles pour de l'interprétation du test :

- La population est sensible : le FECR > 95% ET la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% (IC95) > 90%
- La résistance est suspectée : le FECR < 95% OU la limite inférieure de l'IC95 < 90%
- La résistance est avérée : le FECR < 95% ET la limite inférieure de l'IC95 < 90%

Remarque : le calcul de l'IC95 est détaillé dans les Annexes 5 et 6

Avantages et limites du test :

Un des avantages de ce test est sa relative facilité à être mis en œuvre. De plus, plusieurs molécules peuvent être testées au sein d'un même élevage. Une thèse (Richelme et Greil, 2019) a récemment démontré que l'utilisation de la technique de coproscopie de mélange était possible lors de la réalisation de FECRT. En effet, il y a une forte corrélation entre la méthode utilisant la coproscopie de mélange et celle utilisant les coproscopies individuelles pour la réalisation d'un FECRT (coefficient de corrélation de 0.855). Qui plus est, le coefficient kappa de Cohen, mesurant la concordance entre la méthode de référence (utilisation de coproscopies individuelles) et la nouvelle (utilisant des coproscopies de mélange) est de 0,87. Cette observation permet de diminuer nettement les coûts et le temps de travail pour la réalisation du FECRT, en utilisant la technique de coproscopie de mélange.

Concernant les limites de ce test, il faut prendre en compte la prolificité des espèces mises en cause. En effet, *H. contortus* est une espèce particulièrement prolifique. De fait, la disparition, suite à un traitement anthelminthique, d'une population sensible d'*H. contortus*, induira un FECR qui pourra rapidement dépasser le seuil des 95%. A ce moment-là, la résistance d'une espèce bien moins prolifique telle que *T. circumcincta* par exemple, pourra passer inaperçue (Autef, 2015). De plus, la détection de résistances avec ce test est plutôt tardive, puisqu'il est estimé que la résistance est notable lorsqu'il y a plus de 25% d'allèles de résistance au sein d'une population (Papadopoulos, 2008). Enfin, ce test dépend de nombreux facteurs tels que le niveau d'excrétion prétraitement ou encore de la taille des groupes.

Ainsi, lorsqu'une résistance est mise en évidence par ce test, un bilan parasitaire suite à une infestation expérimentale est par la suite conseillé pour démontrer une résistance dans une espèce particulière de strongle digestif. Toutefois, compte tenu des moyens importants à mettre en œuvre pour ce dernier test, il est rarement mis en œuvre sur le terrain, en particulier quand il y a plusieurs élevages testés.

5.1.2 Infestation expérimentale

Ce test est considéré comme le test de référence pour l'évaluation de résistances aux anthelminthiques. Cependant, le protocole à mettre en œuvre est long, couteux,

assez fastidieux et pose des problèmes éthiques. En effet, il passe tout d'abord par la coproculture suivie de la récolte de larves soupçonnées de résistance. Ensuite, les larves L3 qui en sont issues, sont utilisées pour l'infestation expérimentale d'animaux naïfs non parasités. Une fois la durée de la période pré patente atteinte (minimum 3 semaines), deux lots sont faits, un témoin non traité et un dont les animaux sont traités avec la molécule à tester. Par la suite, les animaux sont euthanasiés entre 7 et 15 jours post-traitement, afin de réaliser un comptage parasitaire sur les organes cibles.

La résistance est confirmée si la réduction du nombre d'adultes au sein du lot traité par rapport au lot témoin est inférieure à 90%, ou si plus de 1000 adultes ont survécu (Taylor et al, 2002 ; Erez, Kozan, 2018 ; Coles et al, 2006).

5.2 Tests in vitro

5.2.1 *Egg Hatch Test (EHT) ou test d'éclosion d'œufs*

Ce test permet de détecter les résistances à la famille des BZ uniquement. En effet, ce test se base sur l'activité ovicide des anthelminthiques, or les LM ou encore le LEV n'ont pas cette activité contrairement aux BZ (Taylor et al, 2002 ; Coles et al, 2006).

Pour ce test, des œufs fraîchement récoltés (depuis moins de 3 heures) sont mis à incuber dans une solution de thiabendazole, à différentes concentrations. Le but est de déterminer la DL50, c'est-à-dire la dose pour laquelle 50% des œufs ne se développent pas. Il est également possible de déterminer la dose discriminante, c'est-à-dire la dose pour laquelle 99% des œufs sont tués. La dose discriminante de référence est évaluée à 0.1µg/mL, elle a été établie avec des souches sensibles de nématodes (Papadopoulos, 2008). Si la dose discriminante observée est supérieure à la dose discriminante de référence, alors l'échantillon testé comporte des résistances (Coles et al. 2006). De plus, le pourcentage d'éclosion au-dessus de la dose discriminante indique le pourcentage d'individus résistants au sein de la population.

Ce test présente l'avantage de ne nécessiter qu'un seul prélèvement, cependant, toutes les familles d'anthelminthiques ne peuvent pas être testées. De plus, le test doit être réalisé sur un prélèvement frais (moins de 3 heures), la sensibilité au thiabendazole diminuant avec l'embryogénèse, ce qui peut alors générer un faux négatif. Tout comme le FECRT, les résistances ne sont détectables que si minimum 25% des allèles au sein d'une population sont des allèles mutants (Erez, Kozan, 2018). Enfin, ces tests ne semblent pas toujours reproductibles et la corrélation au FECRT peut être faible. En effet, ce test ne tient pas compte du métabolisme ou de la pharmacologie des molécules dans les tests in vivo.

5.2.2 *Test de développement larvaire*

Parmi les tests effectués sur les larves, le test de développement larvaire est le plus détaillé. Il repose sur l'inhibition de croissance des larves, exposées à différentes concentrations d'anthelminthiques, du stade L1 au stade L3. L'avantage par rapport à l'EHT est que cette fois, le test permet de tester des résistances aux BZ mais également aux LM et au LEV. Tout comme l'EHT, des doses discriminantes peuvent

être déterminées pour évaluer la résistance des nématodes (Jabbar et al. 2006 ; Coles et al. 2006). De plus, une fois la résistance détectée, un examen morphologique des larves résistantes peut permettre d'en déterminer l'espèce. Enfin, il est également considéré comme plus sensible que l'EHT et le FECRT, puisque les résistances seraient détectées dès que 10% des allèles au sein de la population sont des allèles mutés (contre 25% pour les autres tests) (Dobson et al, 1996). Le principal inconvénient par rapport à l'EHT est que ce test est plus long à mettre en œuvre.

Un autre test, basé sur les larves, a fait l'objet d'une tentative de mise en place de procédure standardisée : le test d'inhibition de migration larvaire. Il a pour but de mesurer l'effet paralysant de l'ivermectine sur les L3, qui migrent au sein d'un maillage. Nous ne le détaillerons pas d'avantage étant donné le manque de reproductibilité de ce test, et l'absence de standardisation qui en a découlée.

5.2.3 PCR et séquençage génétique

Ils sont, à l'heure actuelle, les principaux axes de développement pour l'évaluation de résistances aux anthelminthiques. Cependant, ils nécessitent une bonne connaissance des mécanismes moléculaires induisant les résistances, pour chaque famille d'anthelminthique.

Le but est de détecter des changements au niveau du génome, entre des populations sensibles et résistantes. Concernant la recherche de résistances aux BZ, la PCR permet l'amplification spécifique d'un allèle de résistance, contenant la substitution en position 200 de la β -tubuline (cf partie II sous partie 3.2.1). Les autres mutations capables d'induire des résistances aux BZ peuvent également être ciblées. C'est également le cas avec le gène Hco-acr-8 vu précédemment dans la résistance au lévamisole. En effet, il est possible de retrouver par PCR la délétion des 63 paires de bases impliquées dans la résistance à cette molécule.

Parmi les avantages de ces techniques, la recherche des individus hétérozygotes est possible. Ces individus, portant un seul allèle de résistance, peuvent être détectés, ce qui permet l'anticipation des phénomènes de résistances avant qu'ils apparaissent (Silvestre, Cabaret, 2002). De plus, parmi tous les tests évoqués, ce sont ceux qui présentent la sensibilité la plus élevée. En effet, les résistances seraient mises en évidence lorsque seulement 1% de la population présente les allèles de résistance (Papadopoulos, 2008). Enfin, la spécificité et la rapidité sont également augmentées par rapport aux tests *in vivo* et *in vitro* déjà présentés.

Concernant les inconvénients, il faut citer les équipements et réactifs nécessaires à leurs réalisations. De plus, les mécanismes moléculaires induisant les résistances doivent être parfaitement connus, afin de cibler l'allèle responsable de la résistance. Enfin, les mécanismes de résistances non spécifiques ne sont pas pris en compte (Kotze, Prichard, 2016). C'est pour ces raisons qu'à l'heure actuelle, ces techniques sont utilisables pour la détection des résistances aux BZ majoritairement.

6. Prévention de l'apparition de résistance

Pour trouver des solutions afin de limiter l'utilisation des anthelminthiques, des méthodes de gestion des pâtures sont apparues dès les années 1960. Elles consistent à faire en sorte que les animaux soient installés sur des parcelles les plus propres possible. Pour ce faire, 3 grands principes sont appliqués : la prévention, l'évasion et la dilution.

6.1 Stratégies au pâturage

6.1.1 *La prévention*

Le principe des stratégies de prévention est de proposer des parcelles saines (sans larves infestantes) aux animaux en début de pâturage, c'est-à-dire avec un taux d'infestation proche de zéro. Cette stratégie convient surtout pour les animaux les plus sensibles, comme les jeunes par exemple, qui n'ont pas encore eu le temps de mettre en place une immunité face aux strongles.

Dans l'aspect pratique, cela consiste à placer les ovins soit sur une parcelle qui n'a jamais été pâturée par des ruminants, soit qui a subi un assainissement précédemment. Cet assainissement repose sur une absence de pâture pendant une certaine période afin d'éliminer les larves L3 restantes dans l'environnement. Aux vues des conditions climatiques présentes dans nos zones tempérées et de la biologie de certains parasites, ce temps de repos doit être de minimum 6 mois voire 1 an afin d'être sûr d'avoir éradiqué la très grande majorité des larves. Si ce sont les plus pathogènes qui sont uniquement ciblés, à savoir *H. contortus*, cette période de repos peut être réduite, par une phase de gel. En revanche, en l'absence de gel durant la période hivernale, les larves sont capables de survivre plusieurs mois. Lorsque les conditions environnementales sont proches d'un climat tropical, la période de survie est entre 4 et 10 semaines. En effet, les températures élevées sont responsables d'un métabolisme accrue des larves, qui meurent lorsque leurs réserves sont épuisées.

Afin d'accélérer ce processus, la pâture peut être labourée etensemencée, ou une alternance avec une autre espèce de ruminants comme des bovins peut être mise en place. En effet, pour cette dernière solution, les bovins servent de cul de sac épidémiologique du fait de la spécificité d'espèce des nématodes. Ainsi, les larves L3 sont ingérées par les bovins et ne peuvent pas continuer leur cycle, ce qui nettoie la parcelle. En faisant ce type de pâturage alterné, avec des sessions de 2 à 6 mois, des études ont montré qu'il était possible de diminuer la charge parasitaire présente chez les ovins de 70% (Hoste, Guitard, Pons 2003).

6.1.2 *L'évasion*

Les stratégies d'évasion correspondent à la sortie des animaux d'une parcelle avant que celle-ci ne présente un taux d'infestation par des larves L3 trop important. Ils y sont réintroduits une fois que la parcelle est assainie ou que le taux d'infestation est à un niveau acceptable.

Il y a ainsi une rotation entre les différentes pâtures. Cette rotation peut se faire avec 4 à 6 parcelles, les ovins restant 1 semaine sur chaque parcelle. En effet, avec une telle durée, la repousse de l'herbe est également optimisée. Cependant, cette méthode est plus adaptée pour *H. contortus* que pour les deux autres espèces de

parasites, du fait de son taux de survie plus faible. Pour *T. colubriformis* et *T. circumcincta*, sous un climat tempéré, des larves L3 survivantes sont présentes dans les pâtures mêmes plusieurs mois après le passage des animaux. Ce n'est pas le cas pour les climats tropicaux ou subtropicaux, pour lesquels cette rotation de pâture est tout à fait adaptée du fait d'un métabolisme des larves accrues à cause des conditions environnementales plus favorable (Chartier, Camuset, 2012).

6.1.3 La dilution

Le principe de la dilution repose sur le fait de limiter le contact entre les animaux et les parasites. Pour cela, il est important d'éviter les situations de surpâturage. En effet, des études ont montré une corrélation entre le taux d'infestation d'un troupeau et la densité des individus au sein d'une pâture (Torres-Acosta, Hoste 2008). Cela s'explique par le fait qu'en cas de surpâturage, les ovins ont tendance à brouter le plus à ras possible et proche des déjections, des zones souvent concentrées en parasites. Ils sont donc plus à même d'ingérer les larves L3 présentes dans l'environnement.

Afin d'éviter le surpâturage, il est possible de diviser chaque pâture en petite sous-unité et ne faire pâturer le troupeau que sur une sous-unité par jour. Cela permet que les animaux ne s'alimentent pas près des zones riches en excréments. De plus, ce principe, de la même manière que pour la rotation de pâtures, permet une meilleure repousse de l'herbe. En revanche, elle nécessite un travail plus important de la part de l'éleveur (Jacquiet et al., 2018).

Il est enfin possible de faire pâturer une autre espèce de ruminant comme les bovins, en même temps que les ovins. Similaire au principe du pâturage alterné, les bovins présents dans la pâture diluent la charge parasitaire en servant de cul de sac épidémiologique aux larves qu'ils ont ingérées. En revanche, la réduction de la charge parasitaire chez les ovins est moins importante qu'avec la pâture alternée, puisqu'elle est de 30 à 60 % (Hoste, Guitard, Pons 2003). Cette diminution s'observe pour un ratio d'un bovin pour quatre à cinq ovins maximum.

6.2 Gestion de la charge parasitaire

6.2.1 Notion de « refuge »

La notion de « refuge » est apparue au début des années 2000. Elle correspond à la population parasitaire non soumise à un traitement anthelminthique. Cette population comprend donc les larves présentes dans l'environnement, les parasites adultes des individus non traités et les larves en hypobiose non atteintes par les molécules du traitement (Chartier et al., 2015).

L'intérêt de cette population « refuge » est de servir de réservoir d'allèles sensibles dans une population de parasites. En effet, comme ils ne sont pas soumis à une pression de sélection, les allèles de résistances ne voient pas leur prévalence augmenter. Ainsi, lorsque les parasites se reproduisent, les allèles de résistances sont dilués par ceux présents dans le « refuge ». En pratique, cela suppose que les traitements soient réalisés sur une partie du troupeau et non sur la totalité, notamment à la mise à l'herbe. En effet, c'est à ce moment-là que la population « refuge » est la plus faible, puisqu'il ne reste que les larves transhivernantes sur les pâtures et les larves en hypobiose. C'est pourquoi, pour préserver un maximum de parasites sensibles et pouvoir diluer les allèles de résistances, il est préférable d'essayer de

restreindre les traitements. Pour démontrer l'intérêt de la population refuge, une étude a mis en évidence que plus une pâture est contaminée à la base (et donc plus la population refuge est grande), plus il faut de traitements pour voir apparaître une résistance (Abbott, Taylor, Stubbings 2012).

6.2.2 Traitements anthelminthiques raisonnés

Enfin, pour prévenir l'apparition des résistances, certains principes peuvent s'appliquer sur les traitements eux-mêmes.

Tout d'abord, comme vu précédemment, il est possible de traiter seulement une partie du troupeau, en ne traitant que les individus qui en ont le plus besoin. Cela peut se faire de plusieurs façons. La première est de traiter selon l'intensité d'excrétion des individus : des lots d'animaux sont faits pour réaliser des coproscopies de mélange. Si le taux d'OPG est supérieur à un seuil défini, en accord avec l'état général de l'animal (cf partie II sous partie 4.2.1), la décision sera prise de traiter ou non le lot.

Une autre manière est de traiter selon la résilience des animaux. En effet, certains individus sont capables de maintenir une grosse capacité de production en dépit d'une charge parasitaire conséquente. Ainsi, seule la population la moins résiliente aurait besoin d'être traitée. Pour déterminer la résilience, divers outils tels que le score FAMACHA® pour l'anémie provoquée par *H. contortus* notamment ou l'index DISCO pour toutes les espèces de parasites peuvent être utilisés (Torres-Acosta, Hoste 2008, Jacquiet 2015).

Concernant les traitements en tant que tels, plusieurs dispositifs peuvent être mis en place. Tout d'abord, il faut limiter au maximum les sous dosages, en s'assurant d'être en adéquation avec la posologie et la voie d'administration préconisées par le fabricant. Il faut également vérifier le calibrage des pistolets doseurs, la date de péremption et le stockage du médicament. Enfin, il faut essayer d'avoir des animaux à jeun, ce qui permet d'augmenter de 40% la biodisponibilité des BZ et LM (Autef, 2015).

Il faut également favoriser les rotations de molécules. C'est-à-dire ne pas utiliser la même famille de molécules pour deux traitements anthelminthiques successifs. Cela permet de minimiser l'impact de la pression de sélection qui est engendré par une seule famille. Il est également possible de réaliser des traitements avec plusieurs familles de molécules en même temps. En effet, la probabilité qu'un individu exprime les gènes de résistance pour plusieurs familles simultanément reste faible. Ainsi, une famille de molécule pourra éliminer les individus résistants à l'autre famille utilisée et réciproquement. Cependant, une étude a montré que l'utilisation des LM favoriserait l'apparition de résistances aux BZ par mutation du codon 200 de l'isotype 1 de la β -tubuline. Ainsi l'utilisation conjointe de BZ et de LM serait doublement favorable pour les résistances aux BZ (Santos et al., 2017).

Pour conclure, une gestion appropriée des pâturages et une utilisation raisonnée des anthelminthiques permettent de limiter la fréquence des traitements. Cette diminution permet globalement de réduire la pression de sélection exercée par les traitements et donc limite l'apparition des résistances et leurs disséminations.

7. Alternatives aux traitements chimiques

7.1 La vaccination

La vaccination peut être envisagée en tant qu'alternative aux traitements chimiques. En effet, il a été observé que, suite à la première saison de pâture des brebis, ces dernières mettent en place une immunité partielle. A l'heure actuelle, il n'existe qu'un seul vaccin, disponible en Australie (BarberVax), ne ciblant qu'*H. contortus*. C'est un vaccin à « antigènes cachés », c'est-à-dire que les protéines ciblées ne sont pas en contact direct avec l'hôte. Ce sont des protéines présentes dans les cellules intestinales du nématode. Suite à la vaccination, un grand nombre d'anticorps sont produits, ces derniers seront ingérés par le parasite lors de son repas sanguin. Cela induit une mortalité accrue et une importante réduction de la fécondité des femelles.

Il existe également un vaccin recombinant ciblant *T. circumcincta*, basés sur 8 antigènes du parasite. Une récente étude (Gonzales et al. 2019), a étudié l'impact de ce vaccin, sur des races plus ou moins résistantes. Chez les races non résistantes, une diminution significative de la taille des parasites et du nombre d'œufs in utero a été mise en évidence. Bien que non significative chez les animaux résistants, une observation similaire a été faite.

7.2 La sélection génétique

Il existe des individus dits résistants, capables de réguler l'implantation, le développement, la survie et la reproduction des strongles. Ceci étant corrélé avec le fait qu'au sein d'un troupeau, un petit nombre d'individu héberge une grande partie des parasites présents. Le phénomène de résistance étant héritable, cela explique l'intérêt de mettre en place des dispositifs de sélection de ces individus résistants. Cependant, cette résistance pourra être modulée par différents facteurs tels que l'âge, la qualité de l'alimentation, le statut physiologique ou encore la race...

Remarque : cette résistance n'est pas à confondre avec la résilience, qui a été définie précédemment. Cette résilience pourrait être augmentée par la levée des carences en protéines voire une supplémentation en protéine (Hoste, Torres-Acosta, 2011)

L'évaluation de cette résistance est indispensable à la sélection des individus résistants. Pour cela, des outils moléculaires ont été mis en place. Le but de cette approche moléculaire est de détecter certains marqueurs génétiques, associés aux capacités de résistance, afin de prédire la résistance ou non des individus. Cependant, les résistances sont multifactorielles, ce qui complique la détection moléculaire. De plus, un autre facteur limitant vient du fait que des marqueurs identifiés au sein d'une race, sont généralement inutilisables au sein d'une autre race (Jacquet, 2012).

Une autre méthode est possible pour l'évaluation de la résistance des individus. Cette dernière se base sur le phénotype, en évaluant l'intensité d'excrétion d'œufs ou encore la synthèse d'anticorps. C'est cette méthode qui est utilisée dans la sélection de béliers au sein des centres d'élevage de jeunes béliers, destinés à la reproduction. Par ce fait, l'impact de cette sélection est à l'échelle de la race et pas seulement du

troupeau. Plusieurs races font actuellement l'objet de cette sélection (Jacquiet et al. 2009).

7.3 L'utilisation de tannins condensés

Les tanins condensés (différents des tannins hydrolysables, nocifs) ont des propriétés anthelminthiques, et pourraient constituer une des alternatives aux traitements chimiques. Le mode d'action n'est pas encore totalement défini, cependant, il a été observé une diminution de l'excrétion fécale d'œufs chez les animaux ayant consommé des tanins. De plus, des perturbations sévères de la biologie des larves infestantes ont été notées, avec une diminution de l'installation des larves L3 de l'ordre de 50 à 70% (Hostes et al. 2012).

Ces tanins sont présents au sein de certaines légumineuses fourragères (sainfoin, trèfle, lotier...), qui peuvent être utilisées pour l'alimentation des brebis. Ces végétaux, de par leur concentration en tanins, sont considérés comme bioactifs et « nutraceutiques », c'est-à-dire que les effets bénéfiques de leur consommation ne se limitent pas à leurs apports nutritionnels directs (Torres-Acosta, Hoste 2008).

7.4 Utilisation de champignons nématophages

L'espèce *Diddingtonia flagrans* est le champignon nématophage le plus étudié. Les spores de ce parasite ont la capacité de résister au passage dans le tube digestif du ruminant. Par la suite, elles vont coloniser les fèces avec leurs hyphes, et exercer leur activité de prédation sur les larves L3 avant qu'elles ne quittent les fèces. La quantité de larves infestantes disponibles diminue donc suite à la mise en place du maillage tridimensionnel par le champignon. Il n'y aurait, de plus, pas d'impact négatif avec cette méthode sur l'environnement.

A l'heure actuelle, la spécialité BioWorma ND est à l'étude en Europe par l'Agence Européenne du Médicament Vétérinaire.

PARTIE 3 : DYNAMIQUE DES POPULATIONS ET
RESISTANCE DES STRONGLES GASTRO-
INTESTINAUX AUX ANTHELMINTHIQUES, PRE
ET POST TRANSHUMANCE, AU SEIN DE DEUX
ESTIVES PYRENEENE.

1. Introduction

En France, l'élevage ovin allaitant est principalement présent dans la partie grand sud (cf Annexe 7). La zone des Pyrénées, si nous considérons qu'elle regroupe les départements de l'Ariège, la Haute Garonne, les Pyrénées atlantiques, les Hautes-Pyrénées et les Pyrénées-Orientales, constitue une zone d'élevage tout à fait particulière, entre autres par la pratique fréquente de la transhumance (cf Annexe 8). L'élevage d'ovins, dans cette zone précédemment décrite, permet la valorisation de terres, difficilement cultivables et parfois inaccessibles à d'autres espèces (tels que les bovins par exemple). D'après le « Panorama de la filière ovine des Pyrénées française », publié en 2019 dans le cadre du projet PIRINNOVI (projet impliquant 7 organismes espagnols et 12 structures françaises, ayant pour but d'améliorer la durabilité de l'élevage ovin viande dans les Pyrénées, financé par le fonds européen de Développement régional), cette zone pyrénéenne compte plus de 237 000 brebis allaitantes pour plus de 1400 exploitations. La zone Pyrénéenne, zone montagnaise, compte 7 races allaitantes locales particulièrement adaptées à ce territoire, telles que la Tarasconnaise (de loin la plus représentée), l'Aure et Campan, la Barégeoise ou encore la Lourdaise.

Ainsi, l'élevage ovin allaitant représente une filière particulièrement importante pour la valorisation de la zone Pyrénéenne. Il est intéressant de souligner que la pluviométrie de cette zone y est importante (allant de 1300mm de pluie annuellement dans les Pyrénées-Atlantiques à 1000mm en Ariège, pour une moyenne nationale d'environ 750mm), et les épisodes de sécheresses estivales y sont rares. De plus, dans ce système allaitant des Pyrénées, les brebis passent les trois quarts de l'année en extérieur, que ce soit sur les prairies jouxtant les exploitations, où sur les zones montagneuses d'estive. Ces éléments climatiques, ainsi que le système d'élevage, constituent des éléments particulièrement favorables au développement des strongles gastro-intestinaux. Ainsi, les traitements antiparasitaires systématiques y sont répandus, qu'ils précèdent la montée en estive ; dans le but de limiter les phénomènes de transmission de parasites externes tels que les agents de gale par exemple ; ou qu'ils succèdent à celle-ci afin d'éliminer des SGI à l'entrée en bergerie. C'est ainsi que le premier cas français d'*H. contortus* multirésistant, aux BZ et à l'IVM, a été mis en évidence en 2018, au sein de cette zone pyrénéenne (Cazajous et al. 2018). Ces résistances avérées, au sein de troupeaux transhumants, ont alors suscité nombre de questions, concernant notamment le rôle du passage en estive dans la diffusion des vers résistants d'un élevage à un autre.

Pour cette étude, des élevages partageant deux estives pyrénéennes, respectivement dans les départements des Hautes-Pyrénées et de l'Ariège, ont été sélectionnés. Les différentes analyses qui y ont été effectuées, et qui sont détaillées dans cette partie, avaient plusieurs objectifs. Tout d'abord faire un état des lieux des résistances présentes à différentes molécules anthelminthiques au sein de ces élevages, mais également évaluer les changements de populations parasitaires notamment après un passage des animaux en zone d'estive, afin d'évaluer les répercussions de celle-ci. Enfin, une potentielle diffusion des résistances au sein des élevages, après le passage en estive, a également été recherchée.

2. Matériels et méthodes

2.1 Description des élevages participant à l'étude

Le choix des élevages a été principalement dicté par le choix des estives. Pour cela, le docteur Thierry Cazajous, vétérinaire praticien à Mirepeix (64800) pour l'estive des Hautes-Pyrénées et le docteur Jean-Pierre Alzieu, Directeur du Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Ariège pour l'estive Ariégeoise, nous ont été d'une grande aide. En effet, ils nous ont permis de prendre contact avec les éleveurs de chaque estive, afin de pouvoir leur exposer notre projet. La fiche de présentation de notre projet se trouve en Annexe 18.

Au sein de l'estive des Hautes-Pyrénées, tous les élevages présents ont accepté de participer à l'étude. Ce sont tous des élevages de brebis allaitantes, de race Tarasconnaise à l'exception d'un élevage composé de brebis Lourdaises. In fine, ce sont 6 élevages qui ont pu être inclus dans l'étude, ils seront par la suite nommés avec des lettres, de A à F, dans le but de préserver leur anonymat.

Concernant l'Ariège, tous les élevages ayant accès à l'estive n'ont pas souhaité ou pu participer à l'étude. En effet, pour certains, le nombre de brebis était insuffisant pour qu'ils puissent y être inclus. Finalement, 5 élevages ont participé, et, de la même manière, ils seront nommés par la suite avec des lettres, de A' à E', afin de conserver leur anonymat.

En participant à l'étude, les éleveurs s'engageaient à garder au moins une partie de leur troupeau indemne de tout traitement anthelminthique, dans les 3 mois précédant notre venue, aussi bien avant la montée qu'après la descente de l'estive. Ils devaient également permettre à leurs animaux de pacager quelques semaines (minimum 4-5 semaines), avant le début de l'étude. Cette condition était importante pour les prélèvements réalisés avant la montée à l'estive, puisque les brebis venaient de passer l'hiver en bergerie, avec généralement un traitement antiparasitaire réalisé au moment de l'entrée au sein de cette dernière. Ainsi, les prélèvements avant la montée ont eu lieu en mai 2019, et ceux après la descente à cheval sur les mois de septembre et octobre 2019. Un questionnaire a été transmis aux éleveurs, afin de mieux cerner leurs élevages, leurs habitudes de traitements anthelminthiques... (un exemple se trouve en Annexe 19). A la fin de l'étude, un compte rendu personnalisé a été fourni à chaque éleveur, comportant les résultats obtenus dans l'élevage ainsi que des conseils adaptés à la situation observée. Un exemple de compte rendu est disponible en Annexe 20.

Cependant, concernant l'estive Ariégeoise, suite à des soucis de disponibilité des éleveurs ou de non-respect des consignes de pré-visite, il est apparu que le nombre d'élevage présents avant la montée et après la descente était trop faible pour obtenir des résultats sur la dynamique parasitaire suite au passage en estive. L'étude a donc été redirigée sur des évaluations de prévalence des résistances au sein de ces élevages. Ainsi, l'élevage E', non sélectionné au début de l'étude pour un nombre insuffisant de brebis, a été intégré après la descente.

2.2 Description de l'estive des Hautes-Pyrénées

Cette estive est partagée par les 6 éleveurs ayant participé à cette étude. Elle s'étend d'une altitude minimale de 1400 mètres, à environ 2500 mètres pour son altitude maximale.

Tous les individus de ces élevages, susceptibles d'être sélectionnés pour l'étude, sont montés dans la zone d'estive. Avant leur montée, les animaux ont pacagé dans les prairies de basses altitudes, jouxtant les exploitations, durant les mois d'avril et de mai. La montée en estive s'est faite le 8 juin pour l'ensemble des éleveurs, et les dates de descentes ont pu varier en fonction des élevages, s'étendant de fin août à mi-septembre.

Lors de cette estive, les animaux de plusieurs élevages ont pu se côtoyer durant la journée sur l'ensemble de la période.

	Elevage A	Elevage B	Elevage C	Elevage D	Elevage E	Elevage F
Elevage A					X	
Elevage B					X	X
Elevage C					X	
Elevage D						
Elevage E	X	X	X			X
Elevage F		X			X	

Tableau 10 : représentation des rencontres possibles entre les différents troupeaux, au cours de la période d'estive.

Concernant les conditions météorologiques lors de cette transhumance, elles ont été plutôt bonnes avec des températures plutôt chaudes sur les mois de juin et juillet, et à peine plus fraîches pour le mois d'août, d'après les éleveurs et vétérinaires sur place (un relevé de la station météorologique tarde-lourdes-Ossun est disponible en annexe 9). L'herbe n'a d'ailleurs pas manqué, n'entraînant pas de surpâturage.

Concernant la descente, la date en est principalement déterminée par les périodes d'agnelage, à savoir :

- A partir du 20 août pour l'élevage F
- A partir du 10 septembre pour A, B et D
- A partir du 1 octobre pour l'élevage E
- A partir de juillet pour C

Pour finir, il est tout à fait envisageable que les brebis côtoient des isards durant la période estivale.

Remarque : étant donnée l'impossibilité d'étude de l'impact de la période estivale sur le parasitisme des élevages Ariégeois (dont les raisons seront abordés plus tard), l'estive et son fonctionnement ne seront pas décrits.

2.3 Manipulations en élevage

2.3.1 A J0

2.3.1.1 *Constitution des lots*

Concernant la constitution des lots, ils se composent systématiquement de 10 individus. Ces individus ne doivent pas avoir reçu de traitements antiparasitaires dans

les 2-3 mois précédant la série de prélèvements, et doivent également avoir eu accès aux pâtures extérieures pendant 4 semaines minimum avant le J0 de chaque série. Afin de limiter des potentiels biais liés à l'âge des brebis (et donc à l'efficacité du système immunitaire), les brebis des différentes classes d'âges ont été uniformément réparties au sein des différents lots. Ainsi, le nombre de lots par élevage est dépendant du nombre de brebis que les éleveurs ont pu mettre à notre disposition.

Les lots sont établis lors de la première visite J0, et les mêmes brebis sont prélevées pour la seconde visite J14. Comme évoqué dans l'introduction, deux séries de visites (mai et septembre 2019) ont été mises en place, mais concernant la constitution des lots, les brebis ayant été testées en mai n'étaient pas nécessairement les mêmes qu'en septembre.

Estive des Hautes-Pyrénées :

Comme indiqué précédemment (partie III sous partie 2.1), 6 élevages, tous appartenant à la même estive, ont participé à l'étude.

Comme abordé ci-dessus, dans certains élevages, le nombre de lots testés peut varier entre la 1^{ère} série de visite avant la montée en estive, et la seconde après la descente, du fait du nombre de brebis mis à notre disposition. Ainsi, le nombre de brebis disponibles lors de la visite n'était pas toujours suffisant pour permettre de tester toutes les molécules antiparasitaires en même temps. Le choix des molécules testées a donc été fait, lorsque c'était nécessaire, selon les habitudes de traitements au sein de l'élevage. En effet, comme évoqué précédemment, les traitements exercent une pression de sélection favorisant l'émergence de résistances. Les molécules déjà utilisées au sein de l'élevage ont donc été sélectionnées en priorité.

Les tableaux ci-après décrivent les différents lots de 10 brebis, mis en place dans chaque élevage, respectivement en mai et en octobre 2019.

Groupes Elevage	Témoin		Panacur® (Fenbendazole)		Lévamisole® (Lévamisole)		Oramec® (Ivermectine)		Cydectine® (Moxidectine)		Seponver® (Closantel)		Zolvix® (Monépanel)	
	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
C	X	X	X	X						X		X		
D	X	X	X	X		X				X				
E	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X		
F	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X		

Figure 10 : Description des lots réalisés au sein des différents élevages de l'estive des Hautes Pyrénées, lors des prélèvements réalisés avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).

Estive Ariégeoise :

Comme évoqué partie III sous partie 2.1 ; de nombreux problèmes ont jonché cette partie expérimentale. Ils sont responsables des arrêts de protocoles dans certains élevages au moment de la descente des animaux de la zone d'estive, ou encore des entrées tardives (septembre) de certains élevages dans le protocole.

De la même manière que pour la zone des Hautes Pyrénées, les élevages ont été renommés en A', B', C', D', E'.

Groupes Elevage	Témoin		Panacur® (Fenbendazole)		Oramec® (Ivermectine)		Cydectine® (Moxidectine)		Seponver® (Closantel)	
	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept
A'	X		X		X		X		X	
B'	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C'	X	*	X	*	X	*	X	*	X	*
D'		X		X		X		X		X
E'		X		X						

* Nombre de parasites insuffisants à J0 pour pouvoir interpréter des résultats à J14, justifiant l'arrêt du protocole.

Figure 11: Description des lots réalisés au sein des différents élevages de l'estive Ariégeoise, lors des prélèvements réalisés avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (octobre).

2.3.1.2 Prélèvement et marquage

Les échantillons de fèces de chaque individu ont été prélevés directement par voie rectale. Les gants à usage unique étaient changés entre chaque individu et le prélèvement placé individuellement dans un pot hermétiquement fermé. Le numéro de la brebis, visible sur sa boucle auriculaire, était inscrit au marqueur sur le pot correspondant. Ensuite l'ensemble des 10 pots de prélèvement d'un même groupe étaient stockés dans un sac plastique, conservé jusqu'au retour à l'école vétérinaire de Toulouse au sein d'une glacière contenant des pains de glace.

Avant le début des prélèvements, une couleur était attribuée à chaque lot. Suite au prélèvement, et selon le lot auquel la brebis était attribuée, cette dernière était marquée sur le dos de la couleur correspondant, à l'aide d'une bombe de marquage.

Un tableau était alors rempli, répertoriant la couleur attribuée à chaque lot dans chaque élevage, ainsi que le numéro des brebis y étant affectées (cf Annexe 10). Le marquage à l'aide des bombes de couleur ainsi que ce tableau ont permis d'identifier avec certitude les brebis de chaque lot lors de la visite à J14.

2.3.1.3 Traitement

Différentes molécules ont pu être testées lors de cette étude, à savoir : le Fenbendazole (Panacur®), le Lévamisole (Lévamisole®), l'Ivermectine (Oramec®), la Moxidectine (Cydectine®), le Closantel (Seponver®) et le Monépantel (Zolvic®). Toutes les spécialités étant à administration per os. Comme évoqué précédemment, toutes les molécules n'ont pas pu être testées au sein de tous les élevages.

Afin de limiter les sous dosages pour les animaux les plus lourds, ce qui pourrait induire un biais important concernant les résultats coprologiques, le calcul de dose de chaque spécialité a été fait pour un poids de 80kg. En effet, la pesée individuelle de chaque individu n'étant pas réalisable en élevage, ce poids reflète celui des individus les plus lourds pouvant être présents.

Les doses calculées, correspondant à chaque spécialité, sont détaillées dans le tableau ci-dessous et suivent les recommandations des RCP.

Au sein de l'élevage, la dose correspondant à chaque lot était préparée dans une seringue graduée de 20mL, chaque seringue ne servant à l'administration que d'une seule spécialité. La dose était ensuite administrée directement dans la cavité buccale des individus de chaque lot.

Molécule testée	Spécialité	Dosage en mg/kg	Equivalence en mL/kg	Dose mL/brebis
Fenbendazol	Panacur ®	5 mg/kg	0.2 mL/kg	16 mL
Lévamisole	Lévamisole ®	7.5 mg/kg	0.2 mL/kg	16 mL
Ivermectine	Oramec ®	0.2 mg/kg	0.25 mL/kg	20 mL
Moxidectine	Cydectine ®	0.2mg/kg	0.2 mL/kg	16 mL
Closantel	Séponver ®	10 mg/kg	0.2 mL/kg	16 mL
Monépanтел	Zolvix ®	2.5 mg/kg	0.1 mL/kg	8 mL

Tableau 11 : Dosage des différentes molécules et spécialités pour chaque lot.

2.3.2 A J14

Lors de la visite J14, les brebis appartenant aux lots déjà formés à J0 ont été prélevées à nouveau. Ces brebis ont été retrouvées grâce au marquage couleur mis en place lors de la visite J0, et sous le contrôle des numéros de boucles répertoriés dans le tableau précédemment présenté. De la même manière que lors de la visite J0, les fèces ont été prélevées par voie rectale, toujours à l'aide de gants à usage unique, changés entre chaque individu. Pour les individus ne présentant pas de fèces lors de la récolte par voie rectale, une nouvelle tentative a été effectuée une fois toutes les autres brebis prélevées. Il n'était alors pas nécessaire de marquer une nouvelle fois les brebis, et aucun traitement anthelminthique ne leur a été administré.

Quant au protocole de gestion de l'échantillon de chaque individu, il est resté exactement le même que celui du J0, et ce jusqu'à l'examen coprologique.

2.3.3 En estive

Pour chacune des estives, une visite sur le lieu de vie des brebis a été organisée durant la période estivale. Cette visite, qui a été réalisée mi-juillet dans les Hautes-Pyrénées et mi-août en Ariège, avait pour but de récolter des fèces, afin de réaliser des coproscopies, cultures larvaires ainsi que des qPCR. L'ensemble de ces analyses permettant une évaluation de la situation parasitaire en estive. La contention n'étant pas envisageable en zone d'estive, les brebis ont été localisées, puis des échantillons de fèces venant d'être excrétés ont été récoltés à terre. Le prélèvement étant toujours réalisé à l'aide de gants à usage unique, changés entre chaque échantillon. Au total, 20 échantillons ont été récoltés dans chacune des estives, et, de la même manière que lors des J0 et J14, les échantillons ont été mis dans des pots hermétiquement fermés. Le stockage jusqu'au retour à l'école vétérinaire de Toulouse a été fait dans une glacière contenant des pains de glace, et les coproscopies réalisées dans les 48h. Ces 20 échantillons par élevage ont permis, par la suite, la réalisation de deux coproscopies de mélange.

2.4 Manipulations en laboratoires

2.4.1 *Coprosopies de mélange*

Les coprosopies de mélange ont été réalisées dans un délai maximal de 48h après la récolte, et les échantillons stockés au réfrigérateur en attendant l'analyse. Pour réaliser ces coprosopies, 1 gramme de fèces de chaque brebis du même lot ont été prélevés, mélangés et homogénéisés. La méthode utilisée est celle détaillée précédemment dans la partie III la sous partie 4.2.1.

Une fois le comptage des œufs réalisé avec une lame McMaster, le FECR a été calculé. Pour cela, il a été choisi de comparer le nombre d'OPG à J14 du lot testé (T2), au nombre d'OPG à J14 du lot témoin (C2), selon la formule suivante :

$$\text{FECR} = 100 \times \left[1 - \left(\frac{T2}{C2} \right) \right]$$

2.4.2 *Cultures et comptages larvaire*

Concernant les cultures larvaires, tous les échantillons n'ont pas été mis en culture. En effet, pour rappel, cette mise en culture permet le passage du stade d'œuf au stade de larve L3 des strongles gastro-intestinaux présents. Ces larves L3 pouvant ensuite être comptées et identifiées, soit par une analyse morphologique soit par qPCR.

Dans cet objectif, les lots témoins J0 et J14 de tous les élevages ont été mis en culture, permettant d'obtenir par la suite une image à l'instant T de la population parasitaire présente. En plus de ces lots témoins, tous les lots J14 présentant un FECR < 100%, ont également été mis en culture.

Pour cela, environ 5 grammes d'échantillon de chaque individu ont été mélangés dans un pot en plastique. Les pots ont ensuite été humidifiés, placés dans un incubateur à 24°C ± 1 °C, et ré-humidifiés à l'aide d'une pissette d'eau toutes les 48h. A l'issue de 10-12 jours d'incubation, l'extraction des larves L3 a été réalisée selon la méthode de MAAF présentée dans la partie I, sous partie 4.2.2.

Suite à la récolte, une centrifugation à 4500 tours/min durant 10 minutes a été réalisée, un culot de 4-5mL a alors été conservé et le surnageant éliminé. La conservation des suspensions larvaires peut ensuite s'étaler sur plusieurs mois, au réfrigérateur à +4°C.

Concernant le comptage larvaire, le but était d'obtenir une concentration de larves L3/mL. Pour cela, la suspension larvaire précédemment obtenue a été homogénéisée à l'aide d'un vortex. Ensuite, deux comptages ont été réalisés par échantillon, puis leur moyenne a été calculée. Pour la réalisation des comptages, 40µL de suspension ont été prélevés et déposés sur une lame par la suite recouverte d'une lamelle. Les larves reprenant très vite leur mobilité après la sortie de la zone de froid, il a été nécessaire de tuer celles présentes sur la lame, afin d'aboutir à un comptage correct. Pour cela, le dessous de la lame a été soumis à une source de chaleur (allumette). Le comptage était alors réalisé à l'aide d'un microscope au grossissement x50.

Une fois la moyenne des deux comptages par échantillon calculée, une quantité de larve pour 40µL de solution était obtenue. Il a alors suffi d'un produit en croix pour obtenir le nombre de larve par mL (nombre par mL = (moyenne * 1000)/40).

2.4.3 PCR temps réel

Dans le cadre de cette thèse, les qPCR ont été réalisées en simplex. Cela signifie que chaque puit ne contient, en plus de l'échantillon d'ADN à analyser, que des sondes et amorces spécifiques d'une seule des trois espèces majeures de SGI. Ainsi, un puit peut seulement amplifier une séquence d'ADN correspondant soit à *H. contortus*, *T. circumcincta* ou *T. colubriformis*.

- Extraction de l'ADN à partir de la suspension de larves L3

L'extraction de l'ADN est la première étape à réaliser. Dans notre cas, elle a été réalisée à partir des 4-5mL de la suspension de larves L3, récoltées à la suite de la culture. Pour cette extraction, le kit POWERSOIL® a été utilisé, le protocole correspondant est détaillé en Annexe 11.

Après extraction, les échantillons qui n'étaient pas utilisés immédiatement ont été conservés à -20°C.

- Préparation pour mise en plaque

Concernant la qPCR, c'est la technique des sondes Taqman qui a été utilisée (cf partie I sous partie 4.2.3).

Préparation du mix :

Le mix est un mélange de plusieurs composants, qui est déposé à hauteur de 17.5µL dans chaque puit composant la plaque. C'est notamment lui qui contient les sondes et amorces spécifiques de chaque espèce parasitaire.

Il est fabriqué à chaque réaction PCR, et se compose de :

- 10µL de Master Mix (Quantinova Probe PCR Master Mix), qui contient les réactifs nécessaires au déroulement de la qPCR, à savoir les nucléotides, (dNTP), l'ADN polymérase (Taq-polymérase), ses co-facteurs (ions magnésiums) et enfin une solution tampon.
- 5.5µL d'eau BSA (Bovin Serum Albumin), donc le rôle est de favoriser les amplifications de séquences et de limiter les effets des inhibiteurs de PCR.
- 0.5µL d'amorce F (10µM) : c'est une amorce de 20-25 paires de base, spécifique de chaque espèce et qui se fixe au niveau de la partie proximale de la séquence à amplifier.
- 0.5µL de NCR (10µM), cette amorce ci est commune aux 3 espèces de SGI, elle se fixe cette fois à la fin de la séquence à amplifier.
- 1µL de sonde P (2µM): composée d'une trentaine de paires de bases, cette sonde ADN se compose d'un fluorochrome ainsi que de son inhibiteur. Elle est complémentaire d'une séquence ADN contenue entre les amorces F et NCR, et est spécifique de chaque espèce de strongle. L'hydrolyse de cette sonde, induite par la Taq-polymérase durant la phase d'amplification, entraîne la dissociation du fluorochrome et de son inhibiteur, et ainsi l'émission d'un signal fluorescent.

Le détail des sondes et amorces utilisées est disponible dans l'Annexe 12. La sensibilité ainsi que la spécificité de la méthode utilisée ici, ont été vérifiées par Milhes et al, 2017.

Design de la plaque :

Une plaque contient 96 puits, et permet de tester, pour les 3 espèces d'intérêts ici, 8 échantillons d'ADN différents.

	* HC	*Te.C	*Tr.C	* gamme HC	* gamme Te.C	* gamme Tr.C	
Echantillon 1	O O	O O	O O	O O	O O	O O	500
Echantillon 2	O O	O O	O O	O O	O O	O O	250
Echantillon 3	O O	O O	O O	O O	O O	O O	125
Echantillon 4	O O	O O	O O	O O	O O	O O	62
Echantillon 5	O O	O O	O O	O O	O O	O O	31
Echantillon 6	O O	O O	O O	O O	O O	O O	7
Echantillon 7	O O	O O	O O	O O	O O	O O	Mix
Echantillon 8	O O	O O	O O	O O	O O	O O	

Echantillon à tester
Gamme étalon

Légendes :

* HC : mix contenant amorces et sondes spécifiques d'*H. contortus*

* Te.C : mix contenant amorces et sondes spécifiques de *T. circumcincta*

* Tr.C : mix contenant amorces et sondes spécifiques de *T. colubriformis*

* gamme HC : suspension contenant une quantité définie (respectivement 500, 250...) d'ADN d'*H. contortus*

* gamme TE.C : suspension contenant une quantité définie (respectivement 500, 250...) d'ADN de *T. circumcincta*

* gamme Tr.C : suspension contenant une quantité définie (respectivement 500, 250...) d'ADN de *T. colubriformis*

Figure 12 : Représentation schématique d'une plaque PCR.

Ainsi, chaque puit contient une quantité de 17.5µL de mix, contenant sondes et amorces appropriées en fonction de l'espèce à détecter. A ce mix est ajouté 2.5µL d'ADN, provenant des échantillons à tester pour les 6 premières colonnes de chaque ligne, et provenant de suspensions spécifiques pour les 6 dernières. Il y a, pour chaque espèce, deux puits attitrés par échantillon (analyse en duplicate).

Pour ce qui est de la répartition des échantillons au sein des différentes plaques, tous les échantillons d'un même élevage ont été traités sur la même plaque (Cf Annexe 13-14).

Pour cette étude, 2 sessions de qPCR ont été réalisées, la première au printemps 2019 (à la suite de la première série de deux visites) et la seconde à l'automne 2019 (à la suite de la seconde série de visite).

- Courbe étalon

Les courbes étalons sont établies à partir de suspensions larvaires de chacune des espèces, dont les quantités de larves L3 sont connues. Des mesures de fluorescences sont ainsi obtenues à la suite d'une qPCR, qu'il est directement possible de corrélérer avec une quantité de larves. Sur la plaque schématisée ci-dessus (Cf Figure 12), les

48 puits de droite sont destinés à l'établissement de courbes étalons, une pour chaque espèce.

Pour fabriquer les échantillons d'ADN de quantité connue pour chacune des 3 espèces, un plasmide (synthétisé par Eurogentec) contenant les séquences cibles des 3 espèces est inséré dans des bactéries *E.coli* DH5 α transformées. Ces bactéries sont ensuite mises en culture dans le but de multiplier ce plasmide, et, à l'issue de la culture, les plasmides sont extraits et purifiés (kit Nucleospin Plasmid). L'ADN ainsi obtenu est dosé (Multiskan Go μ DropPlate), puis dilué afin d'obtenir des quantités d'ADN équivalents à différents nombres de larves (500, 250, 125,62, 31 et 7.5 larves). Ce sont ces échantillons, de quantité connue, qui sont ajoutés au mix dans les 48 puits de droite, permettant suite à la qPCR l'établissement des courbes étalon.

Pour chaque dilution, de chaque espèce, correspondant donc à un nombre précis et connu de larve, un *Ct* (*Cycle Threshold*) est obtenu suite à la PCR. Ce *Ct* correspond à un nombre de cycle, au-delà duquel le thermocycleur est capable de distinguer la fluorescence émise du bruit de fond. De fait, un échantillon contenant un nombre important de copies d'ADN a un *Ct* plus bas qu'un échantillon contenant un faible nombre de copies d'ADN. En effet, moins de cycles de réplication sont nécessaires pour atteindre le seuil de détection de la fluorescence si un grand nombre de copies sont répliquées dès les premiers cycles.

Ainsi, chaque quantité connue d'ADN, pour chaque espèce, indiquera son propre *Ct*. Ce sont ces valeurs de *Ct* qui permettent d'établir une droite étalon, de la forme $ax + b$ et de pente p .

Suite à l'obtention des 3 droites étalon, il est possible d'évaluer la quantité de larves présentes dans les échantillons à tester, pour chacune des espèces. La formule suivante permet d'obtenir le nombre de larves d'une espèce, présente dans l'échantillon :

$$\text{Nombre de larves} = 10^{\frac{Ct_{\text{échantillon}} - b}{a}}$$

Un exemple de 3 courbes standards, obtenues à l'issue d'une des PCR de l'étude, est disponible en Annexe 15.

Enfin l'efficacité de la PCR doit être calculée et comprise entre 80 et 120%. Elle correspond au nombre d'amplifications de la séquence cible par cycle, et est calculée de la manière suivante :

$$\% \text{ efficacité de la PCR} = 10^{(-1/p)}$$

- Caractéristiques de la réaction PCR

Le thermocycleur Mx3005P déroulent des cycles de la manière suivante :

- Dénaturation de l'ADN à 95°C durant 2 minutes, permettant l'activation de la Taq-polymérase
- 45 cycles d'amplifications dont 30 secondes de dénaturation à 95°C et 1 minute à 53°C pour permettre l'hybridation des amorces, des sondes ainsi que l'amplification de l'ADN

Les résultats sont ensuite analysés avec le logiciel MxProQPCRv4.10 software.

3. Résultats et interprétations

3.1. Calcul des FECR

Le calcul du FECR (% de réduction d'intensité de l'excrétion d'œufs) a été fait à partir de la seconde formule citée Partie II sous partie 5.1.1. Il est, de plus, issu de coproscopies de mélange, pour lesquelles chaque lot comprend 10 individus. De fait, la formule utilisée est la suivante :

$$FECR_{\text{mélange}} = 100 \times \left[1 - \frac{FEC_t}{FEC_c} \right]$$

Où FEC_t = intensité d'excrétion d'œuf en OPG issu de la coproscopie de mélange pour le lot traité

et FEC_c = intensité d'excrétion d'œuf en OPG issu de la coproscopie de mélange pour le lot contrôle

La technique de coproscopie utilisée est la technique de coproscopie de mélange décrite précédemment. Ainsi, le nombre d'animaux par lot a pu varier lors du J14, comme cela a déjà été évoqué. Aucun intervalle de confiance n'a pu être calculé, étant donné qu'une seule coprologie de mélange a été effectuée.

Enfin, pour rappel, la population sera dite sensible lorsque le FECR > 95% (vert), et résistante lorsque FECR < 95% (rouge). Un FECR à 95% sera considéré douteux (orange).

3.1.1 *FECR antérieurs à la transhumance (mai 2019), estive des Hautes-Pyrénées*

Le tableau 12 présente les résultats du FECR pour chaque élevage, avant la montée en estive. Les résultats des FEC (intensité d'excrétion d'œuf en OPG) à J0 et J14 sont présentés, pour les lots témoins et traités pour chacune des molécules.

Elevage \ Lot		Témoïn		Panacur® (fenbendazole)		Lévamisole ® (lévamisole)		Oramec ® (ivermectine)		Cydectine ® (moxidectine)		Seponver ® (closantel)		Zolvix ® (monépantel)	
		J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14
Elevage A	FEC (OPG) <i>n</i>	150 <i>n</i> = 10	200 <i>n</i> = 7	250 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	200 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	600 <i>n</i> = 10	100 <i>n</i> = 8	350 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10
	%FE ^C R			75%		100%		100%		100%		A confirmer PCR		100%	
Elevage B	FEC (OPG) <i>n</i>	1100 <i>n</i> = 10	1000 <i>n</i> = 9	2300 <i>n</i> = 10	950 <i>n</i> = 8	300 <i>n</i> = 10	250 <i>n</i> = 9	600 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	350 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 9				
	%FE ^C R			5%		75%		100%		95%					
Elevage C	FEC (OPG) <i>n</i>	450 <i>n</i> = 10	1100 <i>n</i> = 8	2050 <i>n</i> = 10	750 <i>n</i> = 7										
	%FE ^C R			32%											
Elevage D	FEC (OPG) <i>n</i>	50 <i>n</i> = 10	1000 <i>n</i> = 10	2300 <i>n</i> = 10	650 <i>n</i> = 10										
	%FE ^C R			35%											
Elevage E	FEC (OPG) <i>n</i>	400 <i>n</i> = 10	150 <i>n</i> = 8	200 <i>n</i> = 10	150 <i>n</i> = 8			200 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	150 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	350 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 8		
	%FE ^C R			0%				100%		100%		A confirmer PCR			
Elevage F	FEC (OPG) <i>n</i>	150 <i>n</i> = 10	200 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 9			1500 <i>n</i> = 10	30 <i>n</i> = 10	700 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 10		
	%FE ^C R			75%				85%		100%		A confirmer PCR			

Tableau 12 : FE^CR calculés à partir des coproscopies de mélange J0 et J14, avant la montée en estive.

3.1.2 *FECR faisant suite à la transhumance, estive des Hautes-Pyrénées*

Des manipulations similaires à celles effectuées en mai 2019 ont été faites suite à la descente des animaux des pâtures d'estive. Les animaux ne devant, évidemment, pas avoir été traités avant notre visite.

Des coproscopies de mélange à J0 et J14 ont été réalisées, permettant le calcul de nouveaux FECR. De plus, dans deux élevages, le nombre plus important de brebis disponibles a permis l'évaluation de la résistance des SGI à des molécules antiparasitaires non testées avant la montée en estive. Le tableau 13 ci-après fait état des résultats obtenus :

Elevage \ Lot		Témoïn		Panacur® (fenbendazole)		Lévamisole ® (lévamisole)		Oramec ® (ivermectine)		Cydectine ® (moxidectine)		Seponver ® (closantel)		Zolvix ® (monépanтел)	
		J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14
Elevage A	FEC (OPG) <i>n</i>	750 <i>n</i> = 10	900 <i>n</i> = 10	1400 <i>n</i> = 10	550 <i>n</i> = 9	2250 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 19	1000 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	1100 <i>n</i> = 10	15 <i>n</i> = 10	400 <i>n</i> = 10	350 <i>n</i> = 8		
	%FECR			39%		100%		100%		98% A confirmer PCR, aspect étrange		A confirmer PCR			
Elevage B	FEC (OPG) <i>n</i>	1050 <i>n</i> = 10	1200 <i>n</i> = 9	1000 <i>n</i> = 10	1600 <i>n</i> = 10	500 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 10	1450 <i>n</i> = 10	150 <i>n</i> = 9	1050 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 9				
	%FECR			-33%		96%		88%		100%					
Elevage C	FEC (OPG) <i>n</i>	750 <i>n</i> = 10	850 <i>n</i> = 8	1050 <i>n</i> = 10	200 <i>n</i> = 9					800 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	750 <i>n</i> = 10	250 <i>n</i> = 9		
	%FECR			76%						100%		A confirmer PCR			
Elevage D	FEC (OPG) <i>n</i>	1100 <i>n</i> = 10	700 <i>n</i> = 7	1950 <i>n</i> = 10	200 <i>n</i> = 10	1650 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 8			1400 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 8				
	%FECR			71%		93%				100%					
Elevage E	FEC (OPG) <i>n</i>	550 <i>n</i> = 10	1000 <i>n</i> = 8	900 <i>n</i> = 10	650 <i>n</i> = 9			600 <i>n</i> = 8	0 <i>n</i> = 8	550 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	1150 <i>n</i> = 10	1800 <i>n</i> = 8		
	%FECR			28%				100%		100%		A confirmer PCR			
Elevage F	FEC (OPG) <i>n</i>	1600 <i>n</i> = 10	900 <i>n</i> = 10	1450 <i>n</i> = 10	500 <i>n</i> = 9			2700 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 10	1100 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	500 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 10		
	%FECR			45%				95%		100%		A confirmer PCR			

Tableau 13 : FECR calculés à partir des coproscopies de mélange J0 et J14, après le passage en estive.

3.1.3 Description des résultats de FECR dans l'estive des Hautes-Pyrénées

Pour chaque élevage, les valeurs des FECR ont varié entre mai et septembre (ce point sera abordé dans la discussion). La majorité des défauts d'efficacité des familles d'anthelminthiques, présents avant la montée, ont également été observés après la descente (soit un FECR <95%). Dans certains élevages, certaines molécules n'ont été testées qu'après la descente. Il est donc évident que dans ces cas-là, aucune conclusion quant à l'évolution de la sensibilité des SGI vis-à-vis de ces molécules suite à un passage en estive ne pourra être tirée. Cela représente seulement un complément d'information à un instant T, dans ce cas après la descente, pour des molécules n'ayant pas été testées avant la montée. A l'inverse, l'analyse de la persistance, de l'apparition voire de la disparition de sensibilité vis-à-vis de molécules testées en pré- et post-estive, pourra permettre d'évaluer l'impact de la période estivale sur les populations parasitaires.

Remarque : les FECR du closantel ne peuvent être interprétés à ce niveau-là. En effet, ce dernier n'est efficace que sur l'espèce *H. contortus*, ce sont donc les résultats de PCR qui permettront de statuer pour cette molécule.

Concernant l'élevage A, que ce soit avant la montée ou après la descente en estive, parmi toutes les molécules testées, seul le fenbendazole a montré des FECR < 95% (respectivement 75% et 39%). Les lots lévamisole, ivermectine, et moxidectine, ont, avant la montée et après la descente, présenté des FECR > 95%.

L'élevage B est l'élevage ayant présenté le plus de variabilité concernant la sensibilité des parasites aux molécules testées entre mai et septembre. Quoi qu'il en soit, le FECR du fenbendazole s'est avéré < 95% en pré et post passage en estive. Le lévamisole, qui présentait un FECR de 75% en mai, signant un défaut d'efficacité de cette molécule, a vu son FECR remonter à 96% après la descente. Ceci évoque probablement un phénomène de résistance non disséminé à l'heure actuelle, à l'ensemble des populations parasitaires de l'élevage. En effet, bien que > à 95%, le FECR n'est pas pour autant de 100% en septembre ! Il est également particulièrement intéressant de s'attarder sur l'efficacité de l'ivermectine dans cet élevage. Concernant cette molécule, l'analyse précédant la montée en estive montrait un pourcentage de réduction de 100%. Or, il est à noter que ce n'est plus le cas suite à la période estivale, puisque le FECR n'est plus que de 88%, montrant une diminution de la sensibilité d'au moins une espèce de SGI à cette molécule. Enfin, la moxidectine, qui présentait un FECR de 95% avant la montée en estive, a vu ce dernier revenir à 100% suite à la période estivale. En conclusion, une résistance installée est présente concernant le fenbendazole. Des suspicions, plus ou moins marquées, concernent principalement l'ivermectine et le lévamisole avec un cas particulièrement intéressant de diminution de sensibilité à l'ivermectine, détectée uniquement après la descente des pâturages d'estive. Concernant la moxidectine, elle sera à surveiller à l'avenir.

Dans l'élevage C, le fenbendazole a pu être testé en mai ainsi qu'en septembre. Pour ces deux périodes, le FECR est resté <95%, signant une résistance installée

(respectivement 32 et 75%). Un nombre plus important d'animaux disponibles en septembre a permis l'évaluation de l'efficacité de deux molécules supplémentaires : la moxidectine et le closantel. Pour la moxidectine, le FECR est de 100%. Pour rappel, l'analyse du FECR du closantel ne sera possible qu'après la PCR.

De la même manière que pour l'élevage C, seul le fenbendazole a pu être testé en mai et en septembre dans l'élevage D. Concernant cette molécule, la présence d'une résistance acquise d'une espèce au moins de SGI a été établie, avec des FECR de 35% et 71% lors des deux mesures. En septembre, deux molécules supplémentaires ont pu être testées, le lévamisole et la moxidectine. Concernant le lévamisole un FECR de 93% a été obtenu. La moxidectine a montré une efficacité de 100%.

Dans l'élevage E, quatre molécules ont pu être testées en mai ainsi qu'en septembre, permettant d'évaluer l'impact de la période estivale sur les sensibilités des populations parasitaires. Le fenbendazole, a montré des défauts d'efficacité avec des FECR de 0% et 28%, respectivement en mai et septembre. L'ivermectine et la moxidectine ont été testées, elles se sont montrées efficace à 100% aussi bien en mai qu'en septembre. De fait, excepté le fenbendazole, aucune résistance des SGI n'a été mise en évidence dans cet élevage, que ce soit contre l'ivermectine ou la moxidectine.

Enfin, pour l'élevage F, quatre molécules ont également pu être testées en mai et en septembre. Sans grande surprise comparativement aux autres élevages précédemment cités, une résistance installée contre le fenbendazole a été démontrée, avec des FECR de 75% en mai et 45% en septembre. Pour ce qui est de l'ivermectine, une situation défavorable a été mise en évidence en mai, avec un FECR de 85%. Celle-ci a été relativement confirmée en septembre, avec un FECR de 95%. Ces deux situations allant dans le sens d'une diminution de sensibilité d'au moins une espèce de SGI de cet élevage à l'ivermectine. Enfin, la moxidectine s'est montrée efficace à 100% lors des deux mesures.

Pour conclure, une résistance au fenbendazole a été démontrée dans tous les élevages participants, sans exception. Certains élevages, comme l'élevage A, n'ont présenté de diminution d'efficacité que pour une seule molécule, alors que pour d'autres, des diminutions d'efficacité ont été mises en évidence pour 2 voire 3 molécules différentes. Pour aller plus loin, l'analyse des espèces résistantes et sensibles se révélera particulièrement intéressante, afin de savoir si un défaut d'efficacité est lié à une espèce en particulier ou à plusieurs espèces.

3.2 Comptages larvaires

3.2.1 *Comptage au microscope avant et après la transhumance, estive des Hautes-Pyrénées*

Le comptage larvaire a été réalisé sur les échantillons ayant été mis en culture 10-12 jours auparavant, (protocole précédemment décrit partie III sous partie 2.4.2), sur les lots présentant un FECR < 100% ainsi que sur les témoins J0 et J14. Il a pour

but de valider la présence de larves et, de fait, les bonnes conditions environnementales dans lesquelles la culture s'est déroulée. Il confirme également la viabilité des œufs de parasites présents. Enfin, ce comptage au microscope pourra être comparé à celui réalisé lors de la PCR.

Le tableau 14 présente les résultats du comptage pour chaque élevage, avant et après la transhumance. Les résultats sont donnés en nombre de larve L3 par mL :

		Nombre de larves L3/mL Comptage au microscope												
Lot Elevage	Témoïn				Panacur® (Fenbendazole)		Lévamisole® (Lévamisole)		Oramec® (Ivermectine)		Cydectine® (Moxidectine)		Seponver® (Closantel)	
	Mai		Sept		Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept
	J0	J14	J0	J14										
<u>Elevage A</u>	25	37.5	200	6500	62.5	200					50	12.5	1075	
<u>Elevage B</u>	50	50	375	1575	887.5	950	37.5	325		250	12.5			
<u>Elevage C</u>	350	162.5	1225	575	562.5	475						550		
<u>Elevage D</u>	1100	375	200	300	362.5	675		50						
<u>Elevage E</u>	687.5	237.5	350	7300	125	550						537.5	750	
<u>Elevage F</u>	12.5	25	650	275	12.5	962.5			0	1075			50	1050

Tableau 14 : Comptage larvaire au microscope des coprocultures des différents lots des élevages de l'estive des Hautes Pyrénées, avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).

3.2.2 Identification et quantification des larves de SGI par PCR temps réel pré et post transhumance, estive des Hautes-Pyrénées

Lors des tests PCR, permettant de déterminer précisément les espèces de parasites présentes dans les différents lots, la quantité des larves par mL est obtenue. Le tableau 15 présente ces résultats.

Nombre de larves L3/mL ; Comptage PCR															
Elevage	Lot	Témoin				Panacur® (Fenbendazole)		Lévamisole® (Lévamisole)		Oramec® (Ivermectine)		Cydectine® (Moxidectine)		Seponver® (Closantel)	
		Mai		Sept		Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept
		J0	J14	J0	J14										
<u>Elevage A</u>		92	86	84	5882	8	286					0	6	264	
<u>Elevage B</u>		270	258	1098	1890	3722	98924	100	52		592	0			
<u>Elevage C</u>		10586	6192	1326	2068	24462	1694						2020		
<u>Elevage D</u>		3244	2502	364	370	4506	1060		12						
<u>Elevage E</u>		1862	74	78	24440	728	2324					2128	3028		
<u>Elevage F</u>		62	26	2160	8752	0	1548			24	934			186	1766

Tableau 15 : Comptage larvaire par PCR des coprocultures des différents lots des élevages de l'estive des Hautes Pyrénées, avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).

3.2.3 Description des résultats des comptages larvaires microscopique et PCR temps réel

Dans la majorité des cas, on observe une augmentation du nombre de larves, parfois très importante, entre mai et septembre. Cette constatation concernera aussi bien la méthode de comptage microscopique que PCR temps réel. L'augmentation du nombre de larves recueillies dans les coprocultures suit logiquement l'augmentation des intensités d'excrétion d'œufs entre mai et septembre.

De plus, la présence de larves dans ces échantillons indique que les conditions d'incubation ont été favorables à leur développement et que les œufs observés lors des coproscopies étaient bien viables, malgré les traitements anthelminthiques (hors lots témoins). Il y a donc bien une diminution de sensibilité des SGI de ces lots.

En revanche, ce simple comptage larvaire ne permet pas de faire une distinction entre les différentes espèces de SGI. Or, le closantel n'est efficace que contre *H. contortus*. La visualisation de larves dans ce lot ne permet donc pas de conclure sur l'efficacité de la molécule. Les résultats de ce lot ne seront donc pas détaillés ici.

Ainsi, pour l'élevage A, le lot du fenbendazole a été mis en culture avant la montée, en plus des lots témoins (ainsi que le lot closantel). Après la descente, l'observation d'un œuf de conformation anormale pour le lot moxidectine a motivé la mise en culture de ce lot. Des larves (50 L3/mL) ont été observées lors du comptage microscopique, alors qu'aucune n'a été détectée lors du comptage PCR temps réel.

Pour l'élevage B, les lots traités au fenbendazole et au lévamisole ont été mis en culture avant et après le passage en estive. Quelle que soit la méthode de comptage, des larves ont été détectées. De plus, ces résultats restent cohérents avec les intensités d'excrétion d'œufs de ces lots. Pour l'ivermectine, le défaut d'efficacité observé à la descente par la mise en évidence d'œufs dans les coprologies de mélange est confirmé par un comptage de 250 L3/mL en comptage microscopique et 592 L3/mL en PCR temps réel. Enfin, concernant la moxidectine, un FECR <100% avait entraîné une culture larvaire en mai, révélant une quantité de 12.5 L3/mL en comptage microscopique, contre 0 L3/mL en comptage PCR temps réel. Le FECR de 100% pour cette molécule en septembre est responsable de l'absence de mise en culture de ce lot.

Pour les élevages C et E, le fenbendazole a été le seul testé (excepté le closantel) en mai et en septembre. Là encore, des larves de parasites ont été observées suite à la phase d'incubation, quelle que soit la méthode de comptage utilisée, confortant l'hypothèse d'une résistance à cette molécule.

Pour l'élevage D, le lot fenbendazole a été mis en culture avant et après la transhumance, et des larves ont été observées dans les deux situations pour les deux méthodes de comptage. Le lot du lévamisole a été testé uniquement à la descente, à cause du nombre insuffisant d'animaux avant la montée. Ce lot montre tout de même la présence de larves de l'ordre 50 L3/mL après le comptage au microscope et 12 L3/mL après le comptage PCR temps réel.

Enfin, pour l'élevage F, les lots fenbendazole et ivermectine ont été mis en culture avant comme après le passage sur l'estive. Les lots fenbendazole ont permis la visualisation de larves lors du comptage microscopique avant et après la transhumance. Concernant le comptage PCR temps réel, les larves n'ont été détectées qu'après la descente. Concernant l'ivermectine, aucune larve n'a été visualisée pour le lot du mois de mai en comptage microscopique, contre 24 L3/mL par comptage PCR temps réel. Cela pouvant s'expliquer par le très faible taux d'OPG (30 OPG) dans ce lot.

3.3 Identification des espèces de strongles par qPCR

3.3.1 *Antérieure à la transhumance, estive des Hautes Pyrénées*

Le tableau 16 présente les résultats de la qPCR pour chaque élevage, avant la montée en estive. Il indique l'abondance relative des différentes espèces parasites dans les lots ayant été mis en culture, à savoir les lots témoins à J0 et J14 ainsi que les lots J14 traités ayant un FECR < 100%. La qPCR s'est déroulée selon le protocole décrit dans la partie II sous partie 2.4.3.

Répartition des populations parasitaires avant la transhumance							
Elevage \ Lot	Témoïn		Panacur® (Fenbendazole)	Lévamisole® (Lévamisole)	Oramec® (Ivermectine)	Cydectine® (Moxidectine)	Seponver® (Closantel)
	J0	J14	J14	J14	J14	J14	J14
<u>Elevage A</u>	69.6% Tela 28.3% HC 2.2% Tricho	88.4% Tela 11.6% HC	100% Tricho				100% HC
<u>Elevage B</u>	79.3% Tricho 20.7% HC	97.7% Tricho 2.3% Tela	69.2% Tricho 29.4% HC 1.4% Tela	70% Tela 30% Tricho		0	
<u>Elevage C</u>	86.3% Tricho 8.1% Tela 5.6% HC	88.8% Tricho 9.4% Tela 1.9% HC	98.1% Tricho 1% HC 0.8% Tela				
<u>Elevage D</u>	62.3% Tricho 35.1% HC 2.6% Tela	61% HC 32.2% Tricho 6.8% Tela	88.3% Tricho 10.7% HC 1% Tela				
<u>Elevage E</u>	89.7% Tela 9.1% Tricho 1.2% HC	54.1% HC 43.2% Tricho 2.7% Tela	100% Tricho				52.5% Tela 47.5% Tricho
<u>Elevage F</u>	100% Tricho	92.3% Tricho 7.7% Tela	0		100% HC		74.2% Tricho 25.8% Tela

HC = *Haemonchus contortus* ; Tela = *Teladorsagia circumcincta* ; Tricho = *Trichostrongylus colubriformis* ; ND = non déterminé

Tableau 16 : Abondance relative des trois espèces dans les coprocultures en % des lots incubés avant la montée en estive

3.3.2 *Faisant suite à la transhumance, estive des Hautes-Pyrénées*

Le tableau 17 présente les résultats de la qPCR pour chaque élevage, après la descente de l'estive. Il est conçu sur le même modèle que celui précédemment décrit (tableau 16).

Répartition des populations parasitaires après la transhumance							
Lot Elevage	Témoïn		Panacur [®] (Fenbendazole)	Lévamisole [®] (Lévamisole)	Oramec [®] (Ivermectine)	Cydectine [®] (Moxidectine)	Seponver [®] (Closantel)
	J0	J14	J14	J14	J14	J14	J14
<u>Elevage A</u>	78.6% HC 11.9% Tela 9.5% Tricho	89.3% HC 7.3% Tela 3% Tricho	95.8% HC 4.2% Tricho			0	56.1% Tricho 43.9% Tela
<u>Elevage B</u>	74.9% HC 21.7% Tricho 3.5% Tela	91.4% HC 6% Tricho 2.5% Tela	99.8% HC 0.2% Tricho	88.5% HC 11.5% Tela	100% HC		
<u>Elevage C</u>	71.2% Tricho 25% HC 3.8% Tela	68.3% Tricho 28.5% HC 3.2% Tela	78.7% Tricho 20.7% HC 0.6% Tela				97.5% Tricho 2.5% Tela
<u>Elevage D</u>	67.6% Tricho 19.8% Tela 12.6% HC	45.9% Tricho 43.2% HC 10.8% Tela	74% Tricho 25.8% HC 0.2% Tela	50% Tricho 33.3% Tela 16.7% HC			
<u>Elevage E</u>	92.3% Tricho 5.1% HC 2.6% Tela	36.4% Tela 35% Tricho 28.6% HC	97.3% HC 2.5% Tricho 0.2% Tela				52% Tela 48% Tricho
<u>Elevage F</u>	94.1% HC 5% Tricho 0.9% Tela	90.3% HC 9.6% Tricho	86.3% HC 13.6% Tricho 0.1% Tela		100% HC		99.8% Tricho 0.2% Tela

HC = *Haemonchus contortus* ; Tela = *Teladorsagia circumcincta* ; Tricho = *Trichostrongylus colubriformis* ; ND = non déterminé

Tableau 17 : Abondance relative des trois espèces dans les coprocultures en % des lots incubés après la descente de l'estive.

3.3.3 Interprétation

De manière générale, les 3 espèces de parasites recherchées sont bien présentes dans tous les élevages, comme l'illustrent les qPCR réalisées sur les lots témoins. Les abondances relatives sont très variables, aussi bien entre les élevages qu'au sein d'un même élevage au fil du temps. En effet, avant la montée, l'espèce *T. colubriformis* est très présente, avec 4 élevages sur 6 présentant une proportion majoritaire de ce parasite. Cette domination de *T. colubriformis* reflue nettement après le passage en estive, au profit de l'espèce *H. contortus* au moins dans deux élevages. Dans quatre élevages sur six, l'abondance relative d'*H. contortus* a nettement augmenté à la descente d'estive.

Concernant l'élevage A, avant la montée, seule l'espèce *T. colubriformis* est retrouvée 14 jours après traitement au fenbendazole et seule l'espèce *H. contortus* est retrouvée après traitement au closantel. Toutefois, il faut mentionner que les concentrations de larves retrouvées sont très faibles (8 et 6 L3/mL). Au contraire, à la descente d'estive, de plus grands nombres de larves sont retrouvés et l'espèce *H. contortus* est très nettement majoritaire dans le lot traité au fenbendazole et *T. circumcincta* et *T. colubriformis* sont retrouvées à parts égales dans le lot traité au closantel.

Pour l'élevage B, des larves ont été détectées pour les lots fenbendazole et lévamisole, aussi bien avant la montée qu'après la descente de l'estive, indiquant des défauts d'efficacité de ces molécules dans cet élevage. Pour ces deux molécules, les 3 espèces recherchées ont été mises en évidence, dans des proportions différentes selon la période du prélèvement. Il est à noter la détection d'une population d'*H. contortus* résistante au lévamisole uniquement en septembre. A l'inverse, les espèces *T. circumcincta* et *T. colubriformis*, respectivement détectées dans le lot fenbendazole et lévamisole avant la montée, n'étaient plus présentes en septembre. Ces changements pourraient s'expliquer par un effet d'échantillonnage, corroboré par la proportion de ces parasites dans les lots témoins. En effet, la présence massive d'*H. contortus* à la descente, pourrait être responsable d'une « dilution » des deux autres espèces, et donc de l'absence de leur détection. Dans tous les cas, la possibilité qu'un même parasite soit porteur de plusieurs résistances simultanément semble s'exprimer ici. En revanche, l'apparition d'une population d'*H. contortus* résistante à l'ivermectine à la descente de l'estive uniquement, interpelle davantage sur une possible acquisition de parasites porteurs de cette résistance durant l'estive. Enfin, une alerte concernant la moxidectine a été émise avant la montée, avec un FECR de 95%. Des larves ont été observées lors du comptage au microscope, mais cela n'a pas été confirmé par le comptage PCR. De la même manière pour l'élevage A, aucune des 3 espèces recherchées n'a été mise en évidence.

Pour l'élevage C, une résistance au fenbendazole est détectée aussi bien à la montée qu'à la descente. Celle-ci concerne *H. contortus* et *T. colubriformis*. Pour l'espèce *T. circumcincta*, elle est détectée par la PCR avant et après la descente. Cependant l'abondance relative de cette espèce s'effondre après le traitement (atteignant 0.6% en mai et 0.8% en septembre), ce qui n'est pas le cas des autres espèces. Devant ces chiffres, cette espèce n'est pas considérée comme résistante à

cette molécule. En ce qui concerne le closantel, qui n'a été étudié qu'à l'automne, seules les espèces *T. circumcincta* et *T. colubriformis* ont été retrouvées après traitement. Ces dernières n'étant pas sensibles au closantel, à l'inverse d'*H. contortus*, une diminution de sensibilité d'*H. contortus* au closantel peut être exclue dans cet élevage.

Dans l'élevage D, la résistance au fenbendazole chez *H. contortus* et *T. colubriformis*, est une nouvelle fois observée. Concernant *T. circumcincta*, avant la montée elle est très faiblement représentée dans les lots témoins (4.7% de moyenne), et quasiment absente après le traitement (1%). Après la descente, elle se révèle présente en plus grande proportion dans les lots témoins (15.3% en moyenne), et à nouveau quasiment absente après traitement (0.2%). Ainsi, on ne peut pas considérer cette espèce comme résistante à cette molécule. Concernant le lévamisole, cette molécule n'a été testée qu'au moment de la descente de l'estive. Devant le faible nombre d'OPG détectés (50 OPG après traitement contre 1650 OPG pour ce lot avant traitement), et le faible nombre de larves en ayant découlé, il est difficile de conclure avec certitude à une résistance de l'ensemble des espèces parasitaires, bien que ces dernières aient toutes été détectées à la PCR temps réel.

Pour l'élevage E, concernant le fenbendazole, *H. contortus* et *T. colubriformis*, présentent une résistance à cette molécule. Concernant *T. circumcincta*, la situation reste similaire à celle des élevages C et D, avec une très faible proportion de parasites après traitement, et des proportions plus aléatoires dans les lots témoins. Il est donc difficile de conclure à une résistance au fenbendazole pour cette espèce. Concernant le closantel, aucun *H. contortus* n'a été retrouvé, ce qui permet d'exclure une résistance à cette molécule dans cet élevage.

Concernant l'élevage F, bien qu'aucune larve n'ait été détectée pour le lot fenbendazole avant la montée (les hypothèses de cette situation seront évoquées dans la discussion), les 3 espèces de strongles ont été détectées à la descente. En revanche, étant donné le faible taux détecté après traitement pour *T. circumcincta* (0.1%), il est difficile de conclure à une résistance de ce parasite, il pourrait s'agir plutôt d'une population résiduelle. Pour le closantel, une résistance peut être exclue, puisqu'aucune larve d'*H. contortus* n'a été détectée. En revanche, dans cet élevage, une résistance à l'ivermectine est portée uniquement par une population d'*H. contortus*, aussi bien avant la montée qu'à la descente. Cela suggère une résistance plutôt installée dans cet élevage. Il y a donc là aussi un possible cas d'espèce multi résistance, avec une résistance d'*H. contortus* au fenbendazole ainsi qu'à l'ivermectine.

Pour conclure, les résistances aux anthelminthiques se concentrent majoritairement au sein de 2 espèces de strongles, *H. contortus* et *T. colubriformis*. Concernant *T. circumcincta*, sa faible proportion dans les lots post traitements ne permet pas de conclure à des résistances avec certitude. L'efficacité du fenbendazole semble dorénavant compromise à l'encontre d'*H. contortus* et de *T. colubriformis*. De même, le lévamisole présente une grande perte d'efficacité dans 1 des 3 élevages testés, et cela concernant les 3 espèces de parasites. Un second élevage présente des résultats plus mitigés du fait d'une faible quantité d'œufs suite au traitement. En

revanche, la présence d'une population d'*H. contortus* résistante à l'ivermectine, présente dans un élevage sur les deux périodes, et uniquement après le passage en estive dans un autre élevage, laisse entrevoir une potentielle transmission de parasites résistants entre ces élevages au cours de la transhumance. Enfin, aucune résistance n'a été mise en évidence pour la moxidectine et cette partie de l'étude a permis de conclure sur une absence de résistance au closantel chez *H. contortus*.

Remarque : un tableau bilan par élevage, regroupant tous les résultats, est disponible en Annexe 16.

3.4 Bilan des prélèvements d'estive, Hautes-Pyrénées

Comme évoqué précédemment, 20 échantillons de fèces fraîchement produits ont été récoltés mi-juillet, soit environ 5 semaines après la montée des brebis. Ils ont permis la réalisation de deux coproscopies de mélange, puis d'une culture larvaire, d'un comptage au microscope et enfin d'une qPCR. Les protocoles sont restés identiques à ceux précédemment décrits et utilisés pour les deux séries de visites. Les résultats sont présentés dans le tableau 18 :

	FEC (OPG)	Comptage larvaire manuel en L3/mL	Comptage larvaire PCR en L3/mL	Résultats qPCR
Echantillon 1	650	37.5	140	83.3% Tricho 16.7% Tela 0% HC
Echantillon 2	150	12.5	8	75% Tricho 25% Tela 0% HC

Tableau 18 : Résultats FEC, comptages larvaires manuels et qPCR, et analyse des espèces parasitaires présentes, sur les prélèvements faits en estive, Hautes-Pyrénées.

Une excrétion d'intensité moyenne a été observée dans les coprologies de mélange. Ces résultats sont plutôt cohérents, en termes d'ordre de grandeur, avec les résultats des coproscopies de mélange réalisées avant la montée.

Concernant les comptages larvaires, qu'ils soient au microscope ou par qPCR, l'échantillon 1 a conduit à une production de larves L3 plus importante que l'échantillon 2. Ceci étant en accord avec les OPG dénombrés lors des coproscopies.

Enfin, concernant les espèces présentes ainsi que leurs proportions, *T. colubriformis* est l'espèce majoritaire (83.3% et 75% respectivement dans les échantillons 1 et 2), de la même manière que lors de la série de prélèvement avant la montée. *T. circumcincta* est également présente, alors qu'*H. contortus* ne semble pas présente. Une inversion de l'espèce majoritaire a été évoquée dans la sous partie 3.3.3 ; après la descente de l'estive, en faveur d'*H. contortus* et au détriment de *T.*

colubiformis. Les résultats présentés ci-dessus semblent indiquer que cette inversion ne s'était pas encore faite à la mi-juillet, lors de la réalisation des prélèvements.

3.5 Cas de l'Ariège

Comme souligné dans la partie III sous-partie 2.1, un seul éleveur de l'estive Ariégeoise a participé pleinement à cette étude, aussi bien avant la montée qu'à la descente de leur transhumance. Il est donc difficile de conclure quant à une éventuelle dynamique de transfert de parasites résistants aux anthelminthiques dans cette estive. Les données obtenues permettent tout de même de réaliser un état des lieux à un instant T, sur les résistances présentes ainsi que sur les espèces parasitaires porteuses de ces résistances

3.5.1 *Calcul des FECR*

Les tableaux suivants présentent les résultats FECR pour chaque élevage, avant la montée et après la descente en estive. Les résultats des FEC (intensité d'excrétion d'œuf en OPG) à J0 et J14 sont présentés, pour tous les lots témoins et traités. Le protocole mis en place pour l'obtention de ces résultats est le même que celui utilisé pour l'estive des Hautes-Pyrénées, et décrit dans la partie III sous partie 2.4.

Elevage \ Lot		Témoin		Panacur® (Fenbendazole)		Oramec® (Ivermectine)		Cydectine® (Moxidectine)		Seponver® (Closantel)	
		J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14
Elevage A'	FEC _(OPG) <i>n</i>	2850 <i>n</i> = 10	3700 <i>n</i> = 8	1900 <i>n</i> = 10	1100 <i>n</i> = 8	1350 <i>n</i> = 10	100 <i>n</i> = 8	1050 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	5450 <i>n</i> = 10	100 <i>n</i> = 10
	%FECR			70%		97%		100%		A confirmer par PCR	
Elevage B'	FEC _(OPG) <i>n</i>	1700 <i>n</i> = 10	250 <i>n</i> = 7	800 <i>n</i> = 10	100 <i>n</i> = 9	4000 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 10	1650 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 9	500 <i>n</i> = 10	250 <i>n</i> = 8
	%FECR			60%		80% à confirmer à la PCR		80% à confirmer à la PCR		A confirmer par PCR	
Elevage C'	FEC _(OPG) <i>n</i>	450 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 9	200 <i>n</i> = 10	100 <i>n</i> = 8	200 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 9	300 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 9	200 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 9
	%FECR			67%		100%		100%		A confirmer par PCR	

Tableau 19 : Résultat des FECR des élevages d'Ariège participant avant la transhumance.

Elevage \ Lot		Témoin		Panacur® (Fenbendazole)		Oramec® (Ivermectine)		Cydectine® (Moxidectine)		Seponver® (Closantel)	
		J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14	J0	J14
Elevage B'	FEC _(OPG) <i>n</i>	350 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 10	150 <i>n</i> = 10	350 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	250 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 10	300 <i>n</i> = 10	150 <i>n</i> = 10
	%FECR			50%		100%		100%		A confirmer par PCR	
Elevage D'	FEC _(OPG) <i>n</i>	850 <i>n</i> = 10	900 <i>n</i> = 10	1000 <i>n</i> = 10	400 <i>n</i> = 10	1600 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 6	1550 <i>n</i> = 10	0 <i>n</i> = 9	350 <i>n</i> = 10	650 <i>n</i> = 7
	%FECR			56%		100%		100%		A confirmer par PCR	
Elevage E'	FEC _(OPG) <i>n</i>	200 <i>n</i> = 10	150 <i>n</i> = 10	45 <i>n</i> = 10	50 <i>n</i> = 10						
	%FECR			67%							

Tableau 20 : Résultat des FECR des élevages d'Ariège participant après la transhumance.

Concernant l'élevage A', présent uniquement avant la montée en estive, il représente la plus forte infestation parasitaire tous élevages confondus, notamment avec un lot closantel atteignant une excrétion de 5450 OPG. Sur tous les lots testés, seul le fenbendazole présente un FECR inférieur à 95%, marquant une diminution de sensibilité des SGI à cette molécule. Une alerte est émise pour l'ivermectine car, bien que le FECR soit supérieur à 95%, il n'est pas non plus égal à 100%. Cela suggère potentiellement l'installation en cours d'une résistance à cette molécule. Il aurait donc été particulièrement intéressant de tester à nouveau cette molécule, suite à l'estive, afin de confirmer ou non l'installation de cette résistance au sein de l'élevage. Pour la moxidectine, aucune diminution de sensibilité n'est à signaler, avec un FECR égal à 100%. Enfin, pour le closantel, comme pour la partie précédente concernant l'estive des Hautes-Pyrénées, seule l'identification précise des larves par PCR permet de conclure à la présence ou non d'une résistance. Par conséquent, les données concernant cette molécule ne seront pas abordées dans cette sous partie.

Pour l'élevage B', seul élevage présent durant les deux étapes de l'étude, il est à noter un FECR inférieur à 95% concernant le fenbendazole aussi bien à la montée qu'à la descente (valeurs respectivement de 60% et 50%). Ces valeurs indiquent, par conséquent, une diminution de sensibilité des SGI à cette molécule, bien installée au sein de cet élevage. Concernant la moxidectine et l'ivermectine, un FECR de 80% est observé avant la montée pour chacune d'elle. Cependant, après la descente, ces taux se normalisent et un FECR égal à 100% est observé. A noter cependant une forme anormale des œufs pour les lots moxidectine et ivermectine avant la montée, ce qui laisse supposer que ces derniers pourraient ne pas être viables. Auxquels cas, il ne serait pas possible de conclure à une résistance des SGI à ces molécules. La culture ainsi que la PCR pourront confirmer ou infirmer cette hypothèse. Mais, dans tous les cas, si diminution de sensibilité il y a, cette dernière n'est vraisemblablement pas encore tout à fait installée au sein de l'élevage.

Les élevages C'et D' étaient présents respectivement uniquement avant la montée et uniquement après la descente. Il y a, dans les deux cas, un FECR inférieur à 95% pour le fenbendazole, marquant une diminution de sensibilité à cette molécule dans ces élevages. En revanche, la moxidectine et l'ivermectine, également testées, ne présentent pas de signes de résistances, avec un FECR égal à 100%.

Enfin, concernant l'élevage E', présent uniquement après la descente de l'estive, seul le fenbendazole a pu être testé, à défaut d'un nombre suffisant d'animaux pour constituer d'autres lots. Le résultat reste, cependant, identique aux élevages présentés précédemment, à savoir un FECR d'une valeur <95% (67%), suggérant qu'au moins une espèce de SGI de cet élevage présente une résistance à cette molécule.

Pour conclure, le constat concernant le fenbendazole reste similaire à celui de l'estive des Hautes-Pyrénées. A savoir que ce dernier semble avoir perdu une grande partie de son efficacité dans ces élevages Ariégeois. Cependant, l'impact de la transhumance sur une potentielle dynamique de transmission des résistances n'est pas évaluable, tout comme la dynamique des espèces parasites en elle-même, faute de données suffisantes après la descente. Pour les autres molécules, elles

semblent encore efficaces, malgré des alertes sur la moxidectine et l'ivermectine au sein de certains élevages.

3.5.2 Comptages larvaires manuel et PCR

De la même manière que pour l'estive des Hautes-Pyrénées, les lots témoins à J0 et J14 ainsi que les lots ayant reçu un traitement et pour lesquels le FECR calculé est $< 100\%$ ont été mis en culture pour obtenir des larves L3. Cette mise en culture a suivi le protocole décrit dans la sous partie 2.4.2 de la partie III. Une fois l'incubation terminée, un comptage manuel des larves ainsi qu'un comptage PCR ont été réalisés, selon la méthode décrite précédemment. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-dessous.

		Nombre de larves L3/mL Comptage manuel										
Elevage \ Lot	Témoin				Panacur® (Fenbendazole)		Oramec® (Ivermectine)		Cydectine® (Moxidectine)		Seponver® (Closantel)	
	Mai		Sept		Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept
	J0	J14	J0	J14								
<u>Elevage A'</u>	19050	812.5			1550		400				187.5	
<u>Elevage B'</u>	175	12.5	75	175	387.5	50	12.5		0		0	37.5
<u>Elevage C'</u>	25	37.5			187.5						12.5	
<u>Elevage D'</u>			2350	1100		2025						1162.5
<u>Elevage E'</u>			100	125		50						

Tableau 21 : Comptage larvaire manuel des élevages de l'estive d'Ariège, avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).

		Nombre de larves L3/mL Comptage PCR										
Elevage \ Lot	Témoin				Panacur® (Fenbendazole)		Oramec® (Ivermectine)		Cydectine® (Moxidectine)		Seponver® (Closantel)	
	Mai		Sept		Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept	Mai	Sept
	J0	J14	J0	J14								
<u>Elevage A'</u>	428494	5516			7350		2546				2906	
<u>Elevage B'</u>	1438	304	204	782	2918	76	62		22		380	82
<u>Elevage C'</u>	22	24			1134						284	
<u>Elevage D'</u>			6824	5270		10588						1290
<u>Elevage E'</u>			20	400		54						

Tableau 22 : Comptage larvaire par PCR des élevages de l'estive d'Ariège, avant la montée des animaux en estive (mai) et après leur descente (septembre).

Pour l'élevage A', le taux record d'OPG est bien corrélé avec le plus grand nombre de larves comptées, aussi bien manuellement que par PCR. Il est d'ailleurs important de noter que, pour le témoin à J0, la présence massive de larves nous a conduit à diluer l'échantillon afin de rendre le comptage possible. Cette corrélation entre nombre d'OPG et de larves signifie également que les conditions dans lesquelles les œufs ont été placés étaient suffisamment satisfaisantes pour garantir leur éclosion puis leur évolution. L'alerte sur l'ivermectine est ici confirmée par la présence de larves. Ainsi, même si le FECR supérieur à 95%, des individus résistants, certes minoritaires, sont bien présents. La PCR permettra, par la suite, de déterminer la ou les espèces présentant cette diminution de sensibilité.

Concernant l'élevage B', les quantités de larves L3/mL obtenues sont bien plus faibles, là encore en corrélation avec les quantités d'œufs précédemment trouvées. Pour ce qui est des lots ivermectine et moxidectine, dont la morphologie des œufs présentait des altérations au microscope, ils ont bien mené à la production de larves, et étaient donc viables. En dépit de la faible quantité de larves détectées, tant au comptage manuel qu'au comptage PCR, une suspicion de diminution de sensibilité, en début d'installation pour ces 2 molécules, peut être émise. Une vigilance accrue, vis-à-vis de l'utilisation de ces molécules, sera de mise pour l'avenir. Pour la moxidectine, aucune larve n'a été trouvée lors du comptage manuel contre un faible nombre au comptage PCR. Etant donné ce faible nombre de larves trouvées, 22 par mL, l'absence de visualisation de ces larves lors du comptage manuel est probablement imputable à l'effet d'échantillonnage, couplé à la plus faible sensibilité de cette méthode. Pour le closantel, le fait de ne pas observer de larve au comptage manuel semble également imputable à un effet d'échantillonnage, étant donné les faibles valeurs trouvées par le comptage PCR.

Pour les élevages C', D'et E' ; tous les lots mis en culture ont mené à la formation de larves L3, détectées aussi bien manuellement que par PCR. Les taux d'infestations semblent être plus élevés dans l'élevage D' par rapport aux deux autres, là aussi en accord avec les taux d'OPG vus précédemment.

Pour conclure, les conditions d'incubation des œufs ont été satisfaisantes et des larves L3 ont pu se développer. Les doutes émis sur l'aspect des œufs lors de l'étape précédente ont pu être dissipés par la présence des larves, bien qu'en faible quantité.

3.5.3 Identification des espèces de strongles par PCR

Les tableaux suivants présentent les résultats de l'identification par qPCR pour chaque élevage, avant la montée et après la descente en estive. Ils indiquent la répartition des différentes populations parasitaires observées dans les lots ayant été mis en culture, pour rappel les lots témoins J0 et J14 ainsi que les lots traités montrant un FECR < 100% à J14. La qPCR s'est déroulée selon le protocole décrit dans la partie II sous partie 2.4.3.

Répartition des populations parasitaires avant la transhumance						
Elevage \ Lot	Témoin		Panacur [®] (Fenbendazole)	Oramec [®] (Ivermectine)	Cydectine [®] (Moxidectine)	Seponver [®] (Closantel)
	J0	J14	J14	J14	J14	J14
<u>Elevage A'</u>	58% HC 40.6% Tricho 1.4% Tela	56.9% HC 42.4% Tricho 0.7% Tela	95.9% HC 3.8% Tricho 0.2% Tela	96% HC 4% Tricho		94.5% Tricho 5.5% Tela
<u>Elevage B'</u>	95.1% HC 4.9% Tela	59.2% Tricho 40.8% HC	96.8% HC 3.2% Tricho	100% Tela	100% HC	53.7% Tela 46.3% Tricho
<u>Elevage C'</u>	63.6% Tela 36.4% HC	91.7% HC 8.3% Tricho	56.8% Tricho 22.1% Tela 21.1% HC			87.3% Tricho 12.7% Tela

Tableau 23 : Répartition des populations parasitaires en %, des lots incubés avant la montée en estive.

Répartition des populations parasitaires avant la transhumance						
Elevage \ Lot	Témoin		Panacur [®] (Fenbendazole)	Oramec [®] (Ivermectine)	Cydectine [®] (Moxidectine)	Seponver [®] (Closantel)
	J0	J14	J14	J14	J14	J14
<u>Elevage B'</u>	46.1% HC 40.2% Tricho 13.7% Tela	76.5% HC 15.1% Tela 8.4% Tricho	71.1% Tricho 28.9% HC			63.4% Tricho 36.6% Tela
<u>Elevage D'</u>	78.8% Tricho 16.1% Tela 5.1% HC	72.6% Tricho 20.8% Tela 6.6% HC	91.8% Tricho 4.6% Tela 3.6% HC			64.8% Tricho 35.2% Tela
<u>Elevage E'</u>	90% Tricho 10% Tela	88.5% Tricho 11.5% Tela	100% Tricho			

Tableau 24 : Répartition des populations parasitaires en %, des lots incubés après la descente de l'estive.

De manière générale, l'analyse des lots témoins montre la présence des 3 espèces de parasites dans les élevages de cette estive, à l'exception de l'élevage E' qui semble ne pas avoir d'*H. contortus* au sein de son helminthofaune. En revanche, la proportion de ces différentes espèces est assez variable en fonction des élevages, bien qu'*H. contortus* et *T. colubriformis* semblent dominants vis-à-vis de *T. circumcincta*.

Concernant l'élevage A', la diminution de sensibilité observée pour le fenbendazole est étendue à toutes les espèces de parasites recherchées, avec néanmoins une prédominance d'*H. contortus* (déjà dominant dans les lots témoins). Concernant l'ivermectine, l'alerte perçue correspond là aussi à *H. contortus*, et à *T. colubriformis* dans une moindre mesure. Il y aurait donc 2 espèces de parasites multi-résistantes, au fenbendazole et à l'ivermectine dans cet élevage. Enfin, le closantel reste efficace car aucune larve d'*H. contortus* n'a été détectée dans ce lot.

Concernant l'élevage B', la résistance au fenbendazole semble s'étendre uniquement à deux des trois espèces de parasites, à savoir *H. contortus* et *T. colubriformis*. En effet, les larves de *T. circumcincta* n'ont pas été trouvées pour ce lot, ni avant la montée, ni à la descente. Concernant l'alerte du lot ivermectine, seule l'espèce *T. circumcincta* a été détectée, et pour le lot moxidectine c'est *H. contortus* qui semble présenter cette diminution de sensibilité. Il y aurait donc, au sein de cet élevage, non pas une mais deux espèces de parasites pour lesquelles l'acquisition de résistance aux lactones macrocycliques est en cours. L'absence de détection de larves à la descente ne suggère pas nécessairement une élimination de ces résistances après le passage en estive, mais possiblement l'installation récente de ces phénomènes, pas encore répandus à l'ensemble des populations. Enfin, à la montée comme à la descente, le closantel reste efficace. Au bilan, l'espèce *H. contortus*, déjà résistance au fenbendazole, serait en passe de devenir multi-résistante, par l'acquisition d'une résistance à la moxidectine. *T. colubriformis* semble quant à lui uniquement résistant au fenbendazole, et enfin *T. circumcincta* pourrait être en train d'acquérir une résistance à l'ivermectine.

Les élevages C' et D' présentent des résistances au fenbendazole, portées par les 3 espèces parasitaires recherchées. Dans les deux cas, *T. colubriformis* est l'espèce majoritairement observée. Dans les deux élevages, la qPCR permet de conclure à l'absence de résistance au closantel, par l'absence de larve d'*H. contortus*.

Enfin, pour l'élevage E', il semble que l'espèce *H. contortus* ne soit pas présente. En effet, aucune trace d'ADN de ce parasite n'est retrouvée dans les lots témoins ou le lot testé fenbendazole. Une résistance au fenbendazole est observée, mais elle ne concerne qu'une seule espèce : *T. colubriformis*.

Pour conclure, le fenbendazole a perdu une grande partie de son efficacité avec, pour bon nombre d'élevage, plusieurs espèces résistantes à cette molécule. De la même manière que pour l'estive des Hautes-Pyrénées, certains élevages montrent des cas de parasites porteurs de plusieurs résistances. Un début de résistance aux lactones macrocycliques semble également s'installer dans plusieurs élevages, là encore concernant différentes espèces de parasites.

3.5.4 Bilan des prélèvements d'estive, Ariège

Une nouvelle fois, 20 échantillons de fèces fraîchement produites ont été récoltés. Cette fois, la visite a eu lieu mi-août, soit environ 8 semaines après la montée des brebis. Ils ont, comme pour l'estive des Hautes-Pyrénées, permis la réalisation de deux coproscopies de mélange, puis d'une culture larvaire, d'un comptage manuel et enfin d'une qPCR. Les protocoles sont restés identiques à ceux précédemment décrits et utilisés pour les deux séries de visites. Les résultats sont présentés dans le tableau 25 ci-dessous.

	FEC (OPG)	Comptage larvaire manuel en L3/mL	Comptage larvaire PCR en L3/mL	Résultats qPCR
Echantillon 1	500	175	310	52.9% Tricho 47.1% Tela 0% HC
Echantillon 2	300	50	188	92.6% Tela 7.4% HC 0% Tricho

Tableau 25 : Résultats FEC, comptages larvaires manuels et qPCR et analyse des espèces parasitaires présentes, sur les prélèvements faits en estive, Ariège.

Concernant les résultats des coproscopies de mélange, une excrétion d'intensité moyenne a été observée. Ces résultats sont plutôt cohérents, en termes d'ordre de grandeur, avec les résultats des coproscopies de mélange réalisées avant la montée.

Concernant les comptages larvaires, qu'ils soient manuels ou par qPCR, l'échantillon 1 a conduit à une production de L3 plus importante que l'échantillon 2. Ceci étant en accord avec les OPG dénombrés lors des coproscopies.

Enfin, concernant les espèces présentes ainsi que leurs proportions, il y a une hétérogénéité importante entre les deux échantillons. En effet pour le 1^{er}, il y a une quasi-équivalence en termes de proportion entre *T. colubriformis* et *T. circumcincta*, *H. contortus* n'étant pas détecté. Pour le second, c'est cette fois *T. colubriformis* qui n'est pas détecté, avec *T. circumcincta* nettement majoritaire (92.6%) et *H. contortus* détecté en plus faible proportion (7.4%).

Remarque : un tableau bilan par élevage, regroupant tous les résultats, est disponible en Annexe 17.

4. Discussion

4.1 Réalisation expérimentale

4.1.1 *La formation des lots*

Pour la constitution des lots, l'objectif était d'obtenir des lots les plus homogènes possibles, notamment vis-à-vis des classes d'âges les composant. En effet, les jeunes agnelles en première année de pâture sont plus sensibles au parasitisme et montrent des taux d'excrétion fécale d'œufs plus importants. Un âge minimal de 1 an a toutefois été fixé pour la sélection des individus participants, ceux n'ayant que 6 mois n'auraient probablement pas suffisamment pâturé pour que leur helminthofaune soit représentative. Nous avons donc essayé de répartir au mieux les différentes classes d'âge au sein des lots. Le regroupement d'individus jeunes, ayant une immunité moins performante, aurait pu permettre l'obtention de taux d'excrétion plus conséquent et donc de données potentiellement plus faciles à interpréter. Cependant, cela n'aurait pas permis l'obtention d'une réelle image de la situation parasitaire de l'élevage. Il reste à noter que, dans certains élevages, notamment le C et le D de l'estive des Hautes-Pyrénées et le E' de l'estive Ariégeoise, les animaux mis à notre disposition ont été trop peu nombreux pour que nous puissions réaliser une discrimination sur l'âge.

Entre la montée et la descente, les lots n'ont pas été reconstitués à l'identique. En effet, il semblait impossible d'avoir la garantie que la totalité des animaux testés en mai serait toujours présente au retour de l'estive. Cependant, l'étude portant sur l'analyse des résistances à l'échelle de l'élevage et non des individus, ce facteur ne nous a pas paru primordial dans la réalisation de notre expérimentation. La seule exigence, concernant les brebis, était que les individus sélectionnés lors du J0 soit toujours présents lors du J14 de la même série.

4.1.2 *FECR*

Pour les calculs de FECR, nous avons suivi les recommandations de la WAAVP (Coles et al., 2006). Cependant, pour certains élevages, toutes les conditions n'ont pas pu être réunies. En effet, la WAAVP recommande un taux minimal de 150 OPG avant le traitement. Or, le lot traité au fenbendazole dans l'élevage E', montrait un taux initial de 45 OPG. Comme il n'est pas possible de connaître ce résultat au moment des prélèvements, nous avons décidé de poursuivre tout de même l'étude au sein de son élevage, tout en prenant des précautions dans nos interprétations. Ce défaut d'infestation initial est, par ailleurs, une des principales raisons pour lesquelles nous n'avons pas poursuivi l'étude à la descente de l'estive dans l'élevage C'. En effet, ce dernier avait administré, juste avant la montée en estive, une spécialité de moxidectine longue action à l'ensemble de son troupeau. Ainsi, lors du J0 de la série post transhumance, un seul lot atteignait les 100 OPG, les autres atteignant à peine 15 à 50 OPG ; soit moins que les 150 OPG recommandés.

De même, d'après les recommandations de la WAAVP, les lots doivent être constitués de 10 individus, pour que le FECR soit calculé de la manière la plus juste possible. Cependant, pour plusieurs lots, cette condition n'a pas pu être entièrement

respectée, principalement lors des visites J14. Dans ce cas, on peut citer les lots traités au fenbendazole dans les élevages A', C' et F avant la montée, ou encore le lot traité à l'ivermectine à la descente de l'élevage E qui ne compte que 8 individus. Ceci s'explique par le fait que les animaux « manquants » dans l'analyse n'avaient pas de matières fécales au moment de notre passage. Les prélèvements de tous les élevages d'une même estive ne s'étalant que sur une journée, il n'était pas possible de revenir dans les élevages pour prélever ces individus. Il n'était pas non plus possible de prélever davantage d'animaux dès le J0, afin de prévenir ce problème, puisque l'étude se base sur des coproscopies de mélange. Il n'aurait donc pas été possible de retirer des individus du J0, en constatant leur absence à J14. De plus selon les élevages, il n'y avait pas ou peu d'individus supplémentaires à prélever. De fait, pour les élevages concernés par ce manque d'individus à J14, les FECR sont à analyser avec plus de prudence, un léger biais ayant pu être induit.

De même, d'autres facteurs peuvent intervenir dans la variation des FECR calculés. En effet, les quantités d'œufs présents dans les échantillons, et notamment les lots témoins, peuvent grandement influencer le calcul. Pour rappel, la formule de calcul du FECR utilisée ici (Coles et al., 2006) prend en compte le nombre d'OPG dans le lot traité, sur lequel est rapporté le nombre d'OPG du lot témoin J14. Comme cela a été vu avant la montée dans les Hautes-Pyrénées, le seuil d'infestation initial, bien que supérieur à 150 OPG, restait relativement faible (et notamment en comparaison avec les mesures effectuées à la descente). Par conséquent, le moindre œuf observé dans un lot après traitement, a mathématiquement fait fortement diminuer le taux de réduction d'excrétion. Ce paramètre constitue une des raisons majeures de l'évolution parfois importante des FECR entre les prélèvements réalisés avant la montée et après la descente. Un gain de précision étant apporté par un nombre d'OPG initial important. Par exemple, il semble difficile de conclure à une résistance installée à l'ivermectine et à la moxidectine pour l'élevage B', en raison du faible taux d'OPG du lot témoin J14 en mai.

Concernant l'augmentation du taux d'infestation initial après la descente dans certains élevages, essentiellement A, E et F (D dans une moindre mesure), elle peut notamment s'expliquer par la période à laquelle ont été réalisés les prélèvements. En effet, ils ont eu lieu dans les semaines suivant les mises bas (voir au début de celles-ci pour l'élevage E). Pour rappel, dans les élevages précédemment cités, les agnelages débutaient, selon les élevages, entre le 20 août et le 1^{er} octobre. Or, dans cette période péripartum, s'étalant sur les 2-3 semaines avant et après la parturition (« periparturient rise ») une diminution des défenses immunitaires des mères est observée. Les parasites peuvent alors excréter des œufs en plus grande quantité, les défenses de l'hôte luttant de manière moins importante contre leur présence. Cette hypothèse explique, en partie tout au moins, l'excrétion initiale plus importante en septembre, pour les élevages précédemment cités. Pour appuyer cette hypothèse, il est à noter que cette augmentation est moindre à la descente pour l'élevage C. Or, les prélèvements de septembre ont été réalisés longtemps après la période d'agnelage (mi-juillet) dans cet élevage.

Par ailleurs, la variation individuelle d'excrétion d'œufs pourrait expliquer les écarts de FECR observés. En effet, les animaux sélectionnés n'étaient pas les mêmes

avant la montée et après la descente. Les taux d'excrétion dépendent de l'animal, certains individus étant considérés « forts excréteurs ». Ainsi, le fait de ne pas prélever à nouveau à la descente les mêmes individus qu'avant la montée peut amener à des variations de taux d'excrétion. Cependant, son implication est bien plus importante dans la différence qu'il est possible d'observer entre les FECR des différents lots au sein d'un même élevage pour une même visite (J0 par exemple). C'est donc pour cela que, par exemple, les lots traités au fenbendazole à J0 des élevages C et D avant la montée en estive ont un taux d'OPG de plus de 2000 OPG (respectivement 2050 et 2300) alors que les témoins montrent des valeurs inférieures à 500 OPG. Cette différence signe possiblement la présence d'individus « forts excréteurs » dans les lots fenbendazole de ces élevages. Ce sont, d'ailleurs, ces variations individuelles qui justifient le nombre minimal de 10 individus par lot, permettant alors de réduire l'effet échantillonnage. A noter, cependant, un intérêt à ne pas garder les mêmes individus avant la montée et après la descente. Il réside dans le fait de pouvoir évaluer si une résistance est déjà répandue à l'ensemble des individus du troupeau, ou s'il reste des individus possédant une helminthofaune refuge encore sensible à la molécule testée. C'est le cas, par exemple, pour le lot lévamisole de l'élevage B. En effet, avant la montée, le FECR de ce lot est de 75% contre 96% à la descente. Prenant en compte le nombre tout à fait suffisant d'OPG lors des deux séries de visites, ce résultat montre bien que, même si la résistance est présente au sein de l'élevage, elle n'est pas encore disséminée à l'ensemble des individus qui le composent, contrairement à la résistance au fenbendazole par exemple. Ainsi, un usage raisonné de cette molécule permettrait de limiter la propagation de la résistance et la dégradation de la situation, menant à un effondrement de son efficacité.

Concernant les recommandations de la WAAVP pour le calcul de FECR, il est nécessaire que les brebis n'aient pas reçu de traitements antiparasitaires durant les 3 mois précédents les prélèvements. De fait, les brebis pouvaient être traitées avant la montée en estive, mais ne devaient plus recevoir de traitements anthelminthiques avant notre seconde série de visite. C'est ce paramètre qui n'a pas été respecté par l'élevage A', pour lequel l'ensemble des brebis ont été traité 15 jours avant notre visite. C'est la raison pour laquelle il n'y a pas eu de prélèvements en septembre pour cet élevage.

Enfin, les FECRT ont été calculés à partir de coproscopies de mélange. Comme précédemment évoqué (sous partie 5.1.1 de la partie 2), le coefficient kappa de Cohen de 0.87, démontre une bonne concordance entre la méthode utilisant des coproscopies individuelles (méthode de référence) et celle utilisant des coproscopies de mélange (Richelme et Greil, 2019), pour le calcul des FECRT. Sachant cela, et afin d'optimiser les coûts et temps de travail, il a été décidé de travailler avec des coproscopies de mélange lors de la réalisation de cette étude.

4.1.3 Culture larvaire

Pour la mise en culture des œufs, nécessaire à l'obtention de larves L3, stade où l'identification moléculaire par PCR s'applique, nous avons choisi une température de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et une humidification à l'aide d'une pissette d'eau toutes les 48h. Le choix de ces conditions se base sur un compromis entre les besoins des différents

parasites, permettant l'éclosion des œufs et le développement des larves. En effet, ces besoins varient entre les espèces puisque, d'après la Figure 2, l'éclosion des œufs de *T. circumcincta* est favorisée à des températures comprises entre 16 et 30°C contre 25 à 37°C pour les œufs de *H. contortus*. Ainsi, les larves de chaque espèce n'ont pas eu les conditions de développement qui leurs sont tout à fait optimales. Il serait donc possible, que les résultats obtenus après coproculture ne reflètent pas, en termes de proportion, tout à fait la réalité de la situation présente dans l'élevage.

Cependant, les 3 espèces parasitaires ont pu être détectées par PCR sur toutes les plaques, et tous les lots ont bénéficié des mêmes conditions. Les 3 espèces ont donc pu profiter de conditions environnementales permettant l'éclosion des œufs. De plus, ces conditions étant les mêmes aussi bien entre J0 et J14, qu'entre la montée et la descente de l'estive, les variations observées correspondent bien aux variations que l'on retrouve au sein des élevages, même si la valeur absolue du nombre de larves peut être biaisée.

4.1.4 qPCR

Les résultats montrent un nombre de larves plus important en qPCR qu'en comptage au microscope. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence. Tout d'abord, il faut souligner que le comptage au microscope prend en compte les larves de toutes les espèces de strongles digestifs alors que la qPCR ne cible que l'ADN des 3 espèces majeures. Cela pourrait fournir une explication quant à la détection de larves au microscope, et l'absence de larves pour le même lot en comptage qPCR. De plus, un possible effet d'échantillonnage n'est pas à négliger. En effet, le volume initial prélevé est différent, puisque le comptage au microscope s'effectue sur un volume de 40µL d'échantillon, alors que la qPCR en utilise 500µL. Si l'échantillon contient peu de larves, l'effet d'échantillonnage sera plus important avec le comptage au microscope. A noter également l'augmentation brutale des comptages qPCR, lorsque le nombre de larves de l'échantillon dépasse la valeur limite supérieure de la gamme étalon. Ainsi, les numérations sont à considérer avec la plus grande prudence.

En outre, la qPCR a permis une diagnose d'espèce des parasites présents dans les lots témoins, ainsi que dans les lots présentant un FECR <95% soit une potentielle résistance. Ainsi, une comparaison des espèces présentes OPG a pu être faite entre la période précédant la montée et celle suivant la descente. L'espèce *H. contortus* a vu ces abondances relatives augmenter dans tous les élevages, devenant majoritaire dans 3 des 6 élevages de l'estive des Hautes Pyrénées (A, B et F). Ce résultat peut être corrélé avec la période péripartum décrite précédemment (concernant les élevages A, E et F). En effet, avec la baisse d'immunité induite, les parasites profitent d'une fenêtre temporelle leur permettant d'exprimer tout leur potentiel d'émission d'œufs. Or, *H. contortus* est bien l'espèce la plus prolifique, avec près de 5 000 œufs par jour et par femelle contre quelques centaines au mieux pour les deux autres espèces. Ainsi, même si *H. contortus* voit ses proportions augmenter à la descente, cela ne signifie pas que le nombre de *T. circumcincta* et de *T. colubriformis* ait diminué. Mais plutôt que les œufs émis par ces deux espèces bien moins prolifiques sont dilués par la production massive d'œufs dont est capable *H. contortus*.

Cependant, la qPCR ne détecte que 3 espèces parmi tous les strongles digestifs des ovins existants. Même si les 3 espèces recherchées représentent la

majorité de l'helminthofaune et également les espèces les plus pathogènes, les autres espèces présentes dans l'élevage, minoritaires, peuvent-elles aussi – au moins en théorie – développer une résistance. Ainsi, les doutes émis sur les lots traités à la moxidectine des élevages A et B, respectivement à la descente et à la montée, où des larves avaient été visualisées en comptage au microscope mais n'ont pas été confirmées par la PCR, peuvent très bien s'expliquer par la présence d'un parasite tiers, présent en faible quantité mais porteur d'une résistance à cette molécule.

Enfin, la qPCR indique quelles espèces montrent une résistance. Dans certains cas, la même espèce a présenté une résistance à plusieurs molécules au sein d'un même élevage. C'est le cas par exemple de l'élevage B, où des larves d'*H. contortus* ont été retrouvées dans les lots traités au fenbendazole, au lévamisole ou à l'ivermectine. Cependant, elle ne permet pas de savoir si des individus de cette population d'*H. contortus* portent toutes les résistances observées ou si les résistances sont « réparties » entre les individus d'une même population. Par exemple, l'élevage B semble avoir acquis une population d'*H. contortus* résistante à l'ivermectine après la descente. Si ces derniers sont vraisemblablement également résistants au fenbendazole, aux vues de l'incidence de cette résistance au sein de tous les élevages, il n'est pas possible d'affirmer ni d'exclure qu'ils soient résistants également au lévamisole. Il est donc possible, si ce n'est pas encore le cas, que des individus soient porteurs de ces 3 résistances en même temps dans un avenir proche.

4.2 Etude individuelle de l'efficacité des molécules testées

4.2.1 Fenbendazole

Le fenbendazole est la molécule qui a présenté la plus grande perte d'efficacité. En effet, tous les élevages, des deux estives présentes dans cette étude, ont montré des parasites résistants, aussi bien avant la montée qu'après la descente (quand cela a été étudié). Cette résistance semble, de plus, être bien implantée au sein des élevages. En effet, c'est pour le fenbendazole que les taux de réduction d'excrétion calculés ont été les plus bas, sans jamais dépasser la barre des 95%, avec même une valeur de FECR négative pour l'élevage B après la descente (-33%). De plus, l'analyse des espèces résistantes avec la qPCR, suggère que dans la quasi-totalité des élevages, les 3 espèces étudiées présentent cette résistance. En effet, dans l'estive des Hautes-Pyrénées, 5 des 6 élevages ont eu, lors d'une ou des deux séries de visites, les 3 espèces de parasites détectées résistantes. Le constat est similaire pour l'estive Ariégeoise, avec 3 des 5 élevages ayant présentés les 3 espèces de parasites résistants à cette molécule. Ce constat laisse peu d'espoir quant à la présence d'une potentielle population refuge encore sensible. Cette résistance est même répandue au sein d'élevages traitant relativement peu avec les BZ. C'est le cas par exemple de l'élevage B' en Ariège, bien que ce dernier fasse partie des rares élevages à ne pas avoir montré de *T. circumcincta* résistants, que ce soit avant la montée ou après la descente. Or l'arrêt total, ou une baisse drastique de l'utilisation des BZ au sein de ces élevages ne semble pas envisageable. En effet, cette famille de molécule (l'albendazole et le nétohimin particulièrement) est la seule permettant de lutter contre *Dicrocoelium lanceolatum*. Ce parasite, présent également dans la quasi-totalité de ces élevages*, peut avoir des conséquences importantes sur la santé ainsi que sur la productivité des animaux. De fait, les traitements de lutte contre ces autres parasites,

bien qu'ayant initialement d'autres objectifs que la lutte contre les SGI, continuent d'imposer une pression de sélection sur ces derniers, entretenant voire aggravant les résistances au BZ déjà bien présentes. Pour conclure au sujet de cette molécule, et plus généralement au sujet de cette famille, ces résultats confirment la grande prévalence des résistances aux BZ en France, déjà démontrée par de nombreuses études antérieures à celle-ci.

4.2.2 Ivermectine

Nous avons testé l'ivermectine dans 8 élevages, 4 dans les Hautes-Pyrénées et 4 en Ariège. Sur ces élevages, 4 ont, à un moment donné de l'étude, montré un FECR inférieur à 100%. Il y a alors deux situations à différencier. Tout d'abord l'élevage F, pour lequel cette résistance semble installée. En effet elle est retrouvée aussi bien avant la montée qu'après la descente, avec à chaque fois un taux de réduction inférieur ou égal à 95%. De plus, elle concerne la même espèce parasitaire dans les deux séries de mesure. En revanche, cette résistance est suspectée, possiblement en cours d'installation (ne concernant donc pas tous les parasites), dans deux élevages, B et B'. Pour ces deux derniers, cette résistance n'apparaît que sur une des deux périodes étudiées. De même pour l'élevage A', pour lequel nous disposons seulement de prélèvements avant la montée en estive, et pour lequel le FECR, bien que $> 95\%$, n'est tout de même pas égal à 100%.

Concernant l'ivermectine, à chaque fois qu'un FECR $< 100\%$ a été obtenu, des larves ont été produites suite à la coproculture et détectées à la PCR. D'après nos données, cette résistance semble être majoritairement présente chez *H. contortus*, puisqu'il est très majoritaire (voir le seul présent pour les élevages B et F) dans 3 élevages sur 4. Ces résultats rejoignent, une nouvelle fois, des situations qui s'observent ailleurs en France, avec l'inquiétude grandissante de voir apparaître et se multiplier des cas de résistances aux lactones macrocycliques. Ainsi, bien que cette molécule, et plus généralement les avermectines, reste globalement efficace, ces cas résonnent comme une alerte sur une résistance parfois bien installée, ou en cours d'installation, avec le risque de la voir prochainement généralisée.

4.2.3 Moxidectine

Concernant la moxidectine, la situation semble plus favorable pour l'instant. En effet, cette molécule a été testée dans tous les élevages de l'estive des Hautes-Pyrénées et dans 4 des 5 élevages Ariègeois. Sur tous ces élevages, aucun ne présente une résistance installée. En revanche, des alertes sur 3 élevages ont été observées. Pour l'estive des Hautes-Pyrénées, l'élevage A avant la montée et l'élevage B à la descente sont concernés, avec dans les deux cas des FECR restant compris entre 100 et 95%. La molécule est donc néanmoins restée efficace. De plus, aucune larve n'a pu être identifiée par la qPCR dans ces deux élevages, laissant supposer principalement que les individus potentiellement résistants appartiennent à une espèce de strongle différente de celles étudiées ici. Cependant, cela invite à la prudence et à une utilisation raisonnée de cette molécule dans ces élevages, au risque de voir apparaître cette résistance au sein d'une des trois espèces de parasites majeurs. Le dernier élevage concerné par ces alertes est l'élevage B', qui a présenté

avant la montée un FECR de 80%. Pour ce dernier, en revanche, des larves appartenant à l'espèce *H. contortus*, en faible quantité, ont pu être identifiées suite à la coproculture et à la qPCR. Cette résistance, qui n'est visible qu'avant la montée, pourrait bien être en train de s'installer au sein de l'élevage. L'utilisation raisonnée de cette molécule sera, une nouvelle fois, plus que nécessaire, afin de stabiliser voire d'améliorer la situation dans cet élevage. Ainsi, il semblerait que pour les milbémycines également, la situation soit à risque, comme dans le reste de la France.

4.2.4 Lévamisolé

La situation du lévamisolé est également préoccupante. Cette molécule n'a été testée que dans 3 élevages de l'estive des Hautes-Pyrénées. Sur ces 3 élevages, 2 d'entre eux ont présenté des FECR inférieurs à 95%. Concernant l'élevage B, il a présenté avant la montée, un FECR de 75% et, suite à la période estivale, ce dernier est remonté à 96%. Bien que tendant à se normaliser, ces FECR ne sont pas preuve d'une situation parfaitement saine au sein de l'élevage. En effet, ils laissent supposer la présence d'une résistance, qui n'a pas encore diffusé massivement. Pour l'élevage D, le second élevage ayant présenté une résistance à cette molécule, la valeur de 93% du FECR laisse également penser à une situation en train d'évoluer au sein de cet élevage. Il est également à noter que cette résistance semble concerner les 3 espèces de parasites. Là encore, il faut dorénavant réfléchir à des pratiques raisonnées vis-à-vis de cette molécule, afin d'éviter que la situation ne s'aggrave, étant donné que les résistances sont déjà présentes sur le territoire.

4.2.5 Closantel

Le closantel n'étant efficace que sur les nématodes hématophages, c'est-à-dire sur *H. contortus* ici, il a fallu attendre les résultats de la qPCR pour pouvoir conclure sur la présence ou non de résistances à cette molécule. Nous avons étudié cette molécule dans 8 élevages, 4 de chaque estive. Aucune larve d'*H. contortus* n'est ressortie à l'issue des qPCR, à l'exception de l'élevage A avant la montée. Concernant ce résultat, il provient très certainement d'une erreur dans l'identification des prélèvements avec une inversion entre les lots fenbendazole et closantel avant la montée en estive. Ainsi, le closantel reste une molécule encore efficace dans la lutte contre *H. contortus*, son usage étant restant modéré dans les zones d'estive. Il sera donc, à l'avenir, judicieux de préserver cette molécule, encore efficace, pour le traitement des cas d'haemonchoses clinique, plutôt que pour l'usage préventif massif, ce qui pourrait favoriser l'émergence de résistances.

4.2.6 Monépanтел

Enfin, le monépanтел n'a été testé que dans l'élevage A et seulement avant la montée en estive. En effet, à la descente, le nombre de brebis mis à notre disposition ne permettait plus de réaliser un lot traité avec cette molécule. Sur le lot testé avant la montée, aucune résistance n'a été observée. Nous avons fait le choix d'exclure le monépanтел en premier, lorsque le nombre de brebis était limitant. En effet, cette

molécule étant la dernière arrivée sur le marché en France, les éleveurs ne l'avaient jamais utilisée. Par conséquent, la détection de résistance à cette molécule semblait peu probable, nous avons donc favorisé, lorsque c'était nécessaire, des molécules utilisées régulièrement par les éleveurs. Ainsi, il est tout à fait probable que le monépanTEL soit efficace dans tous les élevages. Ce dernier pourra venir au secours d'un arsenal thérapeutique qui serait devenu insuffisant, dans le cas de multirésistances par exemple. Cependant, son utilisation doit rester raisonnée, sachant que des résistances à cette molécule ont déjà été décrites, notamment en Nouvelle-Zélande, après seulement quelques années d'utilisation massive (Scott et al. 2013).

4.3 Prélèvements en estive

Concernant l'estive de l'Ariège, les résultats qPCR montrent une forte disparité d'espèce entre les deux groupes de prélèvements. A noter que les prélèvements réalisés avant la montée en estive, montraient une forte hétérogénéité en termes d'espèce parasites entre les différents troupeaux. Les animaux de ces différents troupeaux étant mélangés au sein de l'estive, il est possible que ce soit cette hétérogénéité, déjà présente avant la montée, qui s'exprime à nouveau lors de ces prélèvements. De plus, tous les élevages participants à cette estive n'ont pas participé à cette étude. Ne connaissant pas la population parasite de ces élevages absents, cela rajoute une cause possible pour expliquer l'hétérogénéité constatée.

Concernant l'estive des Hautes Pyrénées, l'inversion de dominance d'espèces parasite (à la faveur d'*H. contortus*) visible après la descente d'estive, n'avait pas encore eu lieu à la mi-juillet. Pour situer précisément cette inversion, des prélèvements toutes les 2 semaines auraient été nécessaires.

4.4 L'estive, un rôle dans la transmission inter-élevage des résistances ?

Un des objectifs de cette étude, était d'essayer de mesurer le rôle potentiel que pouvait jouer la transhumance sur la dynamique des populations parasites et la transmission éventuelle de résistances entre les élevages. Transhumance qui, rappelons-le, consiste par définition à regrouper les individus de différents élevages en un vaste lieu commun, en montagne, pour l'été. En effet, peu d'études décrivent l'influence potentielle d'un passage en estive sur l'helminthofaune des brebis. Or la multiplication des cas de parasites résistants, voire multirésistants, ne cesse de mettre en avant cette question. Cependant, notre étude ne s'étant étendue que sur une saison (une montée et une descente) de transhumance et ne comportant fondamentalement qu'une seule estive (aux vues des difficultés rencontrées en Ariège), il est difficile de conclure avec certitude sur le rôle exact de la transhumance au sujet des résistances.

Un des résultats les plus intéressants de cette étude, est l'apparition d'une résistance à l'ivermectine au sein de l'élevage B, uniquement après la descente de l'estive. En effet, cette résistance est portée uniquement par *H. contortus*, d'après l'identification moléculaire. Or, avant la montée (également après la descente),

l'élevage F présentait une résistance à l'ivermectine. De plus, les brebis de ces deux élevages partagent des zones de pâtures communes en estive. La probabilité que des brebis de l'élevage B, aient ingéré des larves d'*H. contortus* résistants, émis par les brebis de l'élevage F, n'est donc pas négligeable. Ceci aurait permis à cette souche de parasite d'implanter une résistance au sein de l'élevage B. Cette hypothèse de transmission entre ces deux élevages est d'autant plus renforcée que l'incidence de cette résistance au sein des différents troupeaux est faible, et que ces deux élevages ont une proximité accrue lors de la période estivale. Pour confirmer une telle hypothèse, il aurait fallu réaliser un typage des larves résistantes. Cependant, la mise en œuvre d'un tel projet serait difficile à mettre en place sur le terrain. Ainsi, la transhumance aurait effectivement pu avoir un rôle non négligeable dans l'apparition et la diffusion des résistances au sein des élevages !

Conclusion

La résistance aux anthelminthiques est une réalité à laquelle de plus en plus d'éleveurs doivent faire face. Ils doivent dorénavant composer avec, en adaptant leurs plans thérapeutiques mais aussi leurs pratiques d'élevage. Pour cela, il est nécessaire de comprendre les circonstances d'apparition et de diffusion de ces résistances, afin de prendre conscience des situations à risque, d'anticiper et de s'adapter au mieux lorsque ces dernières sont déjà présentes.

Cette étude, réalisée dans les départements des Hautes-Pyrénées et de l'Ariège, montre qu'à l'image du reste de la France, les résistances aux BZ sont largement répandues. Elles rendent, à certains endroits, cette famille de molécules complètement inefficace contre les SGI. De plus, la situation devient de plus en plus préoccupante pour le lévamisole, car des résistances à cette molécule sont de plus en plus souvent décrites. Le constat est similaire pour les LM, aussi bien les avermectines que les milbémycines. En revanche, le closantel et le monépartel semblent, à l'heure actuelle, conserver leur efficacité et nécessitent désormais une utilisation raisonnée, afin de limiter le plus possible les situations similaires à celle des BZ.

En outre, dans la transmission et l'apparition des résistances, de nombreux facteurs favorisants sont déjà connus. Il est par exemple possible de citer l'introduction au sein des élevages d'individus déjà porteurs de résistances, les traitements systématiques sans évaluation préalable du parasitisme, la fréquence importante des traitements antiparasitaires, l'absence de rotation entre les familles de molécules utilisées... Cependant, il n'est à l'heure actuelle, pas possible d'exclure le passage en estive comme source potentielle de transmission de résistances entre les élevages. En effet, cette étude met en lumière une potentielle implication de la transhumance et donc du regroupement d'individus d'élevages différents, dans l'apparition de résistances au sein d'un élevage. Il serait nécessaire de réaliser davantage d'études sur ce sujet, afin de caractériser au mieux et avec certitude ce risque, pour pouvoir l'appréhender et le maîtriser le mieux possible à l'avenir.

Références bibliographiques

ABBOTT KA., TAYLOR M. et STUBBINGS LA. (2012). Sustainable Worm Control Strategies For Sheep 4th Edition : A technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers. In : *Liver Fluke control in cattle and sheep*. 2012. n° June, p. 1-78.

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

ARSENOPOULOS K. V, FTHENAKIS G. C, KATSAROU E. I, et PAPADOPOULOS E (2021). « Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats », 2021, 28.

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

BAIRD A.W., O'MALLEY, K.E. (1993), Epithelial ion transport - possible contribution to parasite expulsion. *Parasitol Today* 9, 141-143.

BALIC, A., BOWLES, V.M., MEEUSEN, E.N., (2000) The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Adv Parasitol* 45, 181-241

BARTON N. J. (1983). Development of anthelmintic resistance in nematodes from sheep in Australia subjected to different treatment frequencies. In: *International Journal for Parasitology*. 1983. DOI 10.1016/0020-7519(83)90002-4.

BEH KJ, HULM DJ, CALLAGHAN MJ (2002). A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Animal Genetics*, 2002 ; 33, 97-106

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.

BONNEFOND M. et CANELLAS A. (2014). *Optimisation des outils de diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ovins*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 133 p.

BORGSTEEDE F.H.M, DERCKSEN D.D, et HUIJBERS R. (2007). « Doramectin and Albendazole Resistance in Sheep in The Netherlands ». *Veterinary Parasitology* 144, n° 1 (15 mars 2007): 180-83.

BORGSTEEDE F.H.M, VERKAIK J, MOLL L, DERCKSEN D.D, VELLEMA P, et BAVINCK G (2010). « How widespread is resistance to ivermectin among gastrointestinal nematodes in sheep in The Netherlands? ». *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde* 135, n° 21 (1 novembre 2010): 782-85.

BOWMAN, D.D., (1999), *Georgi's Parasitology for Veterinarians*, Seventh Edition Philadelphia, 414 p.

BOWMAN, D.D., (2014). *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 10th Edition. Elsevier, St Louis, Missouri.

BUSSIÉRAS J. et CHERMETTE R. (1995). *Abrégé de parasitologie vétérinaire, III*. Maisons Alfort : Service de parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. ISBN 978-2-900793-04-6.

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.

CABARET J. (2012). Résistance des strongles aux anthelminthiques chez les ruminants. In : *Le point Vétérinaire, numéro spécial « Parasitologie des ruminants »*. 2012. Vol. 43, p. 8-13.

CAZAJOUS T., PREVOT F., KERBIRIOU A., MILHES M., GRISEZ C., TROPEE A., GODART C., ARAGON A. et JACQUIET P. (2018). Multiple-resistance to ivermectin and benzimidazole of a *Haemonchus contortus* population in a sheep flock from mainland France, first report. In : *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2018. Vol. 14, n° March, p. 103-105. DOI 10.1016/j.vprsr.2018.09.005.

CHARTIER C, PORS I, HUBERT J (1998). Prevalence of anthelmintic resistance nematodes in sheep and goats in Western France. *Small Ruminant Research*, 1998 ; 29,33-41

CHARTIER C. et CAMUSET P. (2012). La gestion du pâturage chez les bovins. In : *Le point vétérinaire*. 2012. Vol. 43, p. 22-28.

CHARTIER C., CHAUVIN A. et RAVINET N. (2015). La résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques chez les bovins vers un nécessaire changement de paradigme. In : *Le nouveau praticien vétérinaire - Elevages et santé*. 2015. Vol. 30, p. 23-31.

CINTRA M. C.R., TEIXEIRA V. N., NASCIMENTO L. V. et SOTOMAIOR C. S. (2016). Lack of efficacy of monepantel against *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. In : *Veterinary Parasitology*. 2016. Vol. 216, p. 4-6. DOI 10.1016/j.vetpar.2015.11.013.

COLES G. C., BAUER C., BORGSTEEDE F. H. M., GEERTS S., KLEI T. R. et TAYLOR M. A. (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. In : *Veterinary Parasitology*. 1992. Vol. 44, n° 1992, p. 35-44.

COLES G. C., JACKSON F., POMROY W. E., PRICHARD R. K., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G., SILVESTRE A., TAYLOR M. A. et VERCRUYSSSE J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. In : *Veterinary Parasitology*. 2006. Vol. 136, n° 3-4, p. 167-185. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.11.019.

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.

DE OLIVEIRA P. A., RIET-CORREA B., ESTIMA-SILVA P., COELHO A. C. B., DOS SANTOS B. L., COSTA M. A. P., RUAS J. L. et SCHILD A. L. (2017). Multiple anthelmintic resistance in Southern Brazil sheep flocks. In : *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 2017. Vol. 26, n° 4, p. 427-432. DOI 10.1590/s1984-29612017058

DEMELE J., KRÜCKEN J., ALGUSBI S., RAMÜNKE S., DE GRAEF J., KERBOEUF D., GELDHOF P., POMROY W. E. et VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. (2013). Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. In : *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2013. DOI 10.1016/j.molbiopara.2013.01.004.

- 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
- DOBSON R. J., LEJAMBRE L. et GILL J. H. (1996). Management of anthelmintic resistance: Inheritance of resistance and selection with persistent drugs. In : *International Journal for Parasitology*. 1 août 1996. Vol. 26, n° 8-9, p. 993-1000. DOI 10.1016/S0020-7519(96)80078-6.
- DOBSON R. J., SANGSTER N. C., BESIÉ R. B. et WOODGATE R. G. (2009). Geometric means provide a biased efficacy result when conducting a faecal egg count reduction test (FECRT). In : *Veterinary Parasitology*. 2009. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.12.007.
- EICHSTADT M. (2017). *Evaluation 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, 157p.
- EREZ M. S. et KOZAN E. (2018). Anthelmintic Resistance in Farm Animals. In : *Kocatepe Veterinary Journal*. 2018. Vol. 11, p. 1-9. DOI 10.30607/kvj.429795.
- FALZON L. C., VAN LEEUWEN J., MENZIES P. I., JONES-BITTON A., SEARS W., JANSEN J. T. et PEREGRINE A. S. (2015). Erratum to: Comparison of calculation methods used for the determination of anthelmintic resistance in sheep in a temperate continental climate. In : *Parasitology Research*. 2015. Vol. 114, n° 4, p. 1631-1643. DOI 10.1007/s00436-014-4253-6.
- 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.
- FOURNIER A. (2019) *Etude de la résistance aux anthelminthiques des nématodes gastro-intestinaux chez le mouton en Wallonie*. Travail de fin d'études, Médecine vétérinaire, Université de Liège.
- 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. et BARTRAM D. (2014). Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. In : *Veterinary Parasitology*. 2014. DOI 10.1016/j.vetpar.2014.01.016.
- GHISI M., KAMINSKY R. et MÄSER P. (2007). Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. In : *Veterinary Parasitology*. 2007. Vol. 144, n° 3-4, p. 313-320. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.10.003.
- HEISSL 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., ARROYO LOPEZ C., MANOLARAKI F., ROBERTOS O. N., SOTIRAKI S. et TORRES-ACOSTA J. F. J. (2012). Parasitisme helminthique des ruminants : le paradoxe du pâturage ? In : *Le point vétérinaire*. 2012. Vol. Parasitolo, p. 30; 35.

HUBERT J, KERBOEUF D. (1992) Larval development test for detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *The Veterinary Records*, 1992 ; 130, 442-446

JABBAR A., IQBAL Z., KERBOEUF D., MUHAMMAD G., KHAN M. N. et AFAQ M., (2006). Anthelmintic resistance: The state of play revisited. In : *Life Sciences*. 2006. Vol. 79, n°26, p. 2413 - 2431

JACQUIET P. (1997). Les strongles digestifs des ruminants. In : *Le point Vétérinaire, numéro spécial « Parasitologie des ruminants »*. 1997. Vol. 28, p. 20,21.

JACQUIET P., BARILLET F., BOUIX J., FRANCOIS D., MORENO C. et TEREFE G. (2009). La résistance génétique des ovins aux strongles gastro-intestinaux. In : *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 2009. Vol. 162, n° 1, p. 39-46.

JACQUIET P. (2012). Résistance génétique aux nématodes chez les ruminants. In : *Le point vétérinaire - Parasitologie interne des ruminants*. 2012. p. 42; 47.

JACQUIET P., CANELLAS A., BONNEFONT M., PREVOT F., LIENARD E., MILHES M. et GRISEZ C. (2014). Les outils de dépistage des strongyloses gastro-intestinales chez les ovins. In : *Le nouveau praticien vétérinaire - Elevages et santé*. 2014. Vol. 7 n°.

JACQUIET P., FIDELLE F., LEPETITCOLIN E., PRIVAT S., GAILLAC C., BERGEAUD J.-P. et HOSTE H. (2014). Etat des lieux de la résistance aux anthelminthiques en France chez les ovins. In : *Le nouveau praticien vétérinaire - Elevages et santé*. 2014. Vol. 7 / n°, p. 17,18.

JACQUIET P. (2015). Comment rationaliser les traitements anthelminthiques en élevage ovin ? In : *Le nouveau praticien vétérinaire - Elevages et santé*. 2015. p. 45-50.

JACQUIET P. (2018). Les strongyloses gastro-intestinales des ruminants - Cours de parasitologie, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 2018.

JACQUIET P., AGUERRE S., RUIZ-HUIDOBRO C., GRIZET C., PRÉVOT F., MILHÈS M., SAGOT L., ASTRUC J.-M., FIDELLE F., VIAL-NOVELLA C. et MORENO C. (2018). Comment lutter contre les strongles gastro-intestinaux résistants ? In : *Bulletin des GTV, numéro spéciale*. 2018. p. 45-51.

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.

KERBOEUF D, BEAUMONT-SCHWARTZ C, HUBET J (1988). Résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques chez les petits ruminants. *Recueil de Médecine Vétérinaire* ; 164, 1001-1006

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. In : *International Journal for Parasitology*. 2001. Vol. 31, n° 4, p. 336-345. DOI 10.1016/S0020-7519(01)00131-X.

KOTZE A. C. et PRICHARD R. K. (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. History, Mechanisms and Diagnosis. In : *Advances in Parasitology*. 2016. Vol. 93, p. 397-428. DOI 10.1016/bs.apar.2016.02.012.

LAING R., KIRSTY M, LENKA L, PHILIP J. S, ANDY T, et EILEEN D. (2016) « Analysis of putative resistance gene loci in UK field populations of *Haemonchus contortus* after 6 years of macrocyclic lactone use ». *International Journal for Parasitology* 46, n° 10 (septembre 2016): 621-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.03.010>.

LARSEN J. W. A., VIZARD A. L. et ANDERSON N. (1995). Production losses in Merino ewes and financial penalties caused by. In : *Australian Veterinary Journal*. 1995. Vol. 72, n° 2, p. 58-63.

LEFÈVRE P.-C., BLANCOU J. et CHERMETTE R. (2003). *Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes*. Paris : Tec & Doc. ISBN 978-2-7430-0495-8.

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.

MAAF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. HMSO, London, 1986 ; 160p

MCKENNA P. B. (2006). A comparison of faecal egg count reduction test procedures. In : *New Zealand Veterinary Journal*. 2006. Vol. 54, n° 4, p. 202-203. DOI 10.1080/00480169.2006.36697.

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.

MORGAN E. R., CAVILL L., CURRY G. E., WOOD R. M. et MITCHELL E. S.E. (2005). Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. In : *Veterinary Parasitology*. 2005. Vol. 131, n° 1-2, p. 79-87. DOI 10.1016/j.vetpar.2005.04.021.

O'CONNOR L. J., WALKDEN-BROWN S. W. et KAHN L. P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. In : *Veterinary Parasitology*. 2006. Vol. 142, n° 1-2, p. 1-15. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.08.035.

OVEREND D. J., PHILLIPS M. L., POULTON A.L. et FOSTER C. E. (1994). Anthelmintic resistance in Australian sheep nematode populations. In : *Australian veterinary journal*. 1994. p. 117-121.

PAPADOPOULOS E. (2008). Anthelmintic resistance in sheep nematodes. In : *Small Ruminant Research*. 2008. Vol. 76, n° 1-2, p. 99-103. DOI 10.1016/j.smallrumres.2007.12.012

PARAUD C., PORS I., MARCOTTY T. et DEVOS J. (2014). Un premier cas de résistance aux lactones macrocycliques chez les nématodes gastro-intestinaux confirmé en élevage ovin en France. First description of strongyle resistance to macrocyclic lactones in a sheep flock in France. In : *21ème journée des Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*. 2014. n° 1, p. 325-328.

PLOEGER H. W. et EVERTS R. R. (2018). Alarming levels of anthelmintic resistance against gastrointestinal nematodes in sheep in the Netherlands. In : *Veterinary Parasitology*. 2018. Vol. 262, p. 11-15. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.09.007.

RICHELME A. et GREIL S. (2019). *Évaluation de la résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques dans sept élevages ovins allaitant du Limousin*. Thèse d'exercice, Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017

ROBERTSON A. P., BJORN H. E. et MARTIN R. J. (2018). Resistance to levamisole resolved at the single-channel level. In : *The FASEB Journal*. 2018. Vol. 13, n° 6. DOI 10.1096/fasebj.13.6.749.

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.

SANTOS J. M. L. D., VASCONCELOS J. F., FROTA G. A., RIBEIRO W. L. C., ANDRÉ W. P. P., VIEIRA, L. da S., TEIXEIRA M., BEVILAQUA C. M. L. et MONTEIRO J. P. (2017). Haemonchus contortus β -tubulin isotype 1 gene F200Y and F167Y SNPs are both selected by ivermectin and oxfendazole treatments with differing impacts on anthelmintic resistance. In : *Veterinary Parasitology*. 2017. Vol. 248, n° November, p. 90-95. DOI 10.1016/j.vetpar.2017.11.003.

SANTOS J. M. L. D., VASCONCELOS J. F, FROTA G. A., PEREIRA DE FREITAS E., TEIXEIRA M., VIEIRA, L. da S., BEVILAQUA C. M. L. et MONTEIRO J. P. (2019) « Quantitative Molecular Diagnosis of Levamisole Resistance in Populations of Haemonchus Contortus ». *Experimental Parasitology* 205 (1 octobre 2019): 107734. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107734>.

SARGISON, N.D., (2016). Keys to solving health problems in small ruminants : Anthelmintic resistance as a threat to sustainable nematode control. *Small Rumin. Res.* 142, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.02.021>

SCHALLIG, H.D., (2000), Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 120 Suppl, S63-72.

SCOTT I., POMROY W. E, KENYON P. R, SMITH G, ADLINGTON B, et MOSS A (2013) « Lack of Efficacy of Monepantel against Teladorsagia Circumcincta and Trichostrongylus Colubriformis ». *Veterinary Parasitology* 198, no 1 (15 novembre 2013): 166 71

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

SILVESTRE A. et CABARET J. (2002). Mutation in position 167 of isotype 1 β -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: Role in benzimidazole resistance? In : *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2002. Vol. 120, n° 2, p. 297-300. DOI 10.1016/S0166-6851(01)00455-8.

SMOTHERS C. D., SUN F. et DAYTON A. D. (1999). Comparison of arithmetic and geometric means as measures of a central tendency in cattle nematode populations. In : *Veterinary Parasitology*. 1999. DOI 10.1016/S0304-4017(98)00206-4.

STAFFORD K. A., MORGAN E. R. et COLES G. C. (2009). Weight-based targeted selective treatment of gastrointestinal nematodes in a commercial sheep flock. In : *Veterinary Parasitology*. 2009. Vol. 164, n° 1, p. 59-65. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.04.009.

SUTHERLAND I. et SCOTT I. (2010). *Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle ; biology and control*. Chichester, West Sussex : Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-8582-0.

TANGUY I. (2011). *Évaluation de la résistance des strongles digestifs aux anthelminthiques dans les élevages ovins en Bretagne*. Thèse d'exercice, Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort - ENVA, 2011.

TAYLOR, M.A., COOP, R.L., WALL, R.L., (2016). *Veterinary Parasitology*. 4th Edition. Wiley Blackwell, Chichester.

TAYLOR M. A., HUNT K. R. et GOODYEAR K. L. (2002). *Anthelmintic resistance detection methods*. 2002.

TORRES-ACOSTA J. F.J. et HOSTE H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. In : *Small Ruminant Research*. 2008. DOI 10.1016/j.smallrumres.2008.03.009.

TURNBULL F., JONSSON N., KENYON F., SKUCE P. J., et BISSET S. A. (2018) « P-glycoprotein-9 and macrocyclic lactone resistance status in selected strains of the ovine gastrointestinal nematode, *Teladorsagia circumcincta* ». *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 8, n° 1 (31 janvier 2018): 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.01.004>.

URDANETA-MARQUEZ L, HAN BAE S, JANUKAVICIUS P, BEECH R, DENT J, et PRICHARD R (2014). « A Dyf-7 Haplotype Causes Sensory Neuron Defects and Is Associated with Macrocyclic Lactone Resistance Worldwide in the Nematode Parasite *Haemonchus contortus* ». *International Journal for Parasitology* 44, n° 14 (1 décembre 2014): 1063-71.

URQUHART G. M., ARMOUR J., DUNCAN J. L., DUNN A. M. et JENNINGS F. W., (1996). *Veterinary parasitology*. 2nd ed. Oxford : Blackwell Science. ISBN 978-0-632-04051-3.

VAN DEN BROM, R, MOLL L, BORGSTEEDE F. H. M, VAN DOORN D. C. K, LIEVAART-PETERSON K, DERCKSEN D. P, et VELLEMA P. (2013) « Multiple Anthelmintic Resistance of *Haemonchus contortus*, Including a Case of Moxidectin Resistance, in a Dutch Sheep Flock ». *The Veterinary Record* 173, n° 22 (7 décembre 2013): 552.

VAN DEN BROM, R, MOLL L, KAPPERT C, et VELLEMA P. (2015) « *Haemonchus contortus* Resistance to Monepantel in Sheep ». *Veterinary Parasitology* 209, n° 3 (30 avril 2015): 278-80.

VAN WYK J. A. et FBATH G. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. In : . 2002. Vol. 37, p. 655-670. DOI 10.1051/vetres.

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.

VEILLET F. (2001). *Le closantel : synthèse bibliographique*. Thèse d'exercice, Médecine Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - 2001, 105p.

WOLSTENHOLME A. J., FAIRWEATHER I., PRICHARD R., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G. et SANGSTER N. C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. In : *Trends in Parasitology*. 2004. Vol. 20, n° 10, p. 469-476. DOI 10.1016/j.pt.2004.07.010.

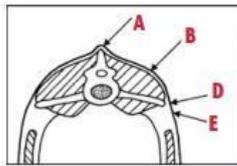
ZAJAC, A. M. (2006). Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants : Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. In : *Veterinary Clinics of North America : Food Animal Practice*. 2006. Vol. 22, n° 3, p. 529-541. DOI 10.1016/J.CVFA.2006.07.006.

ANNEXES

Annexe 1 : Guide pour établir la NEC chez les ovins.

NOTE 1 = brebis très maigre ou émaciée

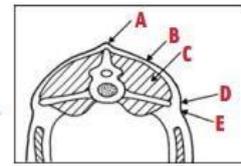
- A > Épine pointue et proéminente
- B > Pas de graisse de couverture
- D > Processus transverses pointus
- E > Les doigts passent facilement dessous et palpent chacun d'eux



Les apophyses épineuses et transverses sont saillantes et pointues. Les doigts passent facilement sous leurs extrémités et entre elles. Le gras de couverture est absent.

NOTE 2 = brebis assez maigre

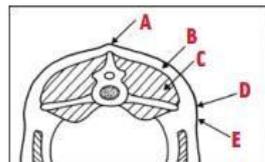
- A > Épine proéminente, mais moins saillante
- B > Fine couverture de graisse
- C > Développement modéré des muscles
- D > Processus transverses arrondis
- E > Une pression est nécessaire pour passer les doigts dessous



Les apophyses épineuses et transverses sont arrondies. Il est possible d'engager les doigts sous l'extrémité de ces dernières. L'épaisseur de la noix du muscle est moyenne, de même que la couverture adipeuse.

NOTE 3 = brebis en état

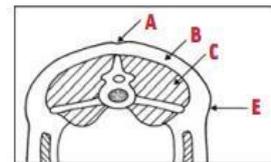
- A > Épine arrondie
- B > Couverture graisseuse modérée
- C > Muscles pleins
- D > Processus transverses arrondis
- E > Une forte pression des doigts est nécessaire pour localiser les pointes osseuses



Les apophyses épineuses forment de légères ondulations souples. Les os peuvent être individualisés sous l'effet d'une pression des doigts. Les apophyses transverses sont bien couvertes. Seule une forte pression permet d'en distinguer les extrémités. La noix du muscle est pleine.

NOTE 4 = brebis grasse

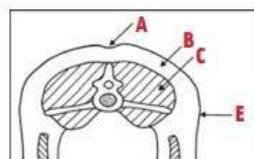
- A > Épine dorsale réduite à une ligne
- B > Épaisse couverture graisseuse
- C > Muscles pleins
- E > Impossible de sentir les processus transverses



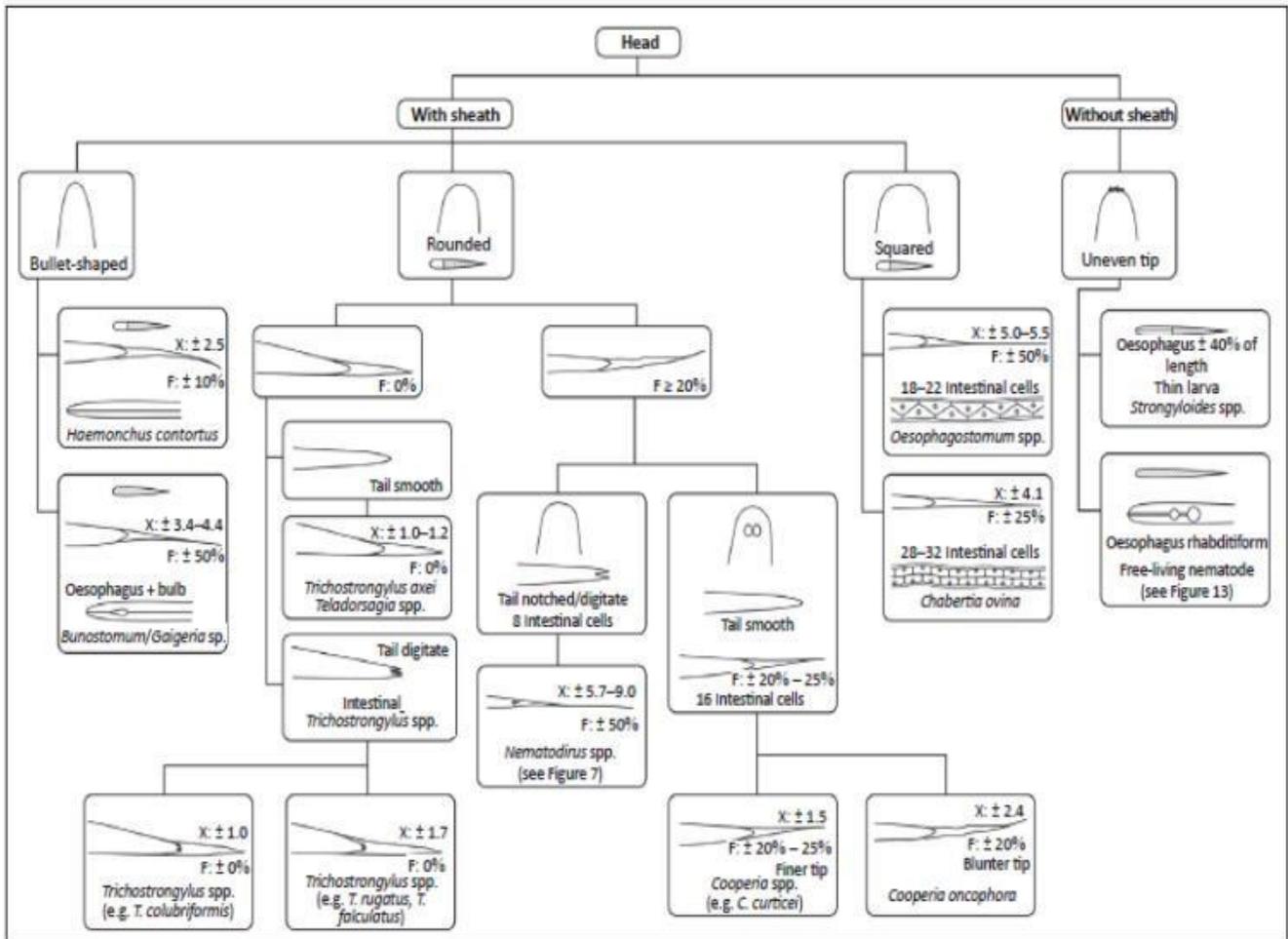
Seule une pression permet de détecter les apophyses épineuses sous la forme d'une ligne dure entre deux muscles. Il est difficile de sentir les apophyses transverses.

NOTE 5 = brebis obèse

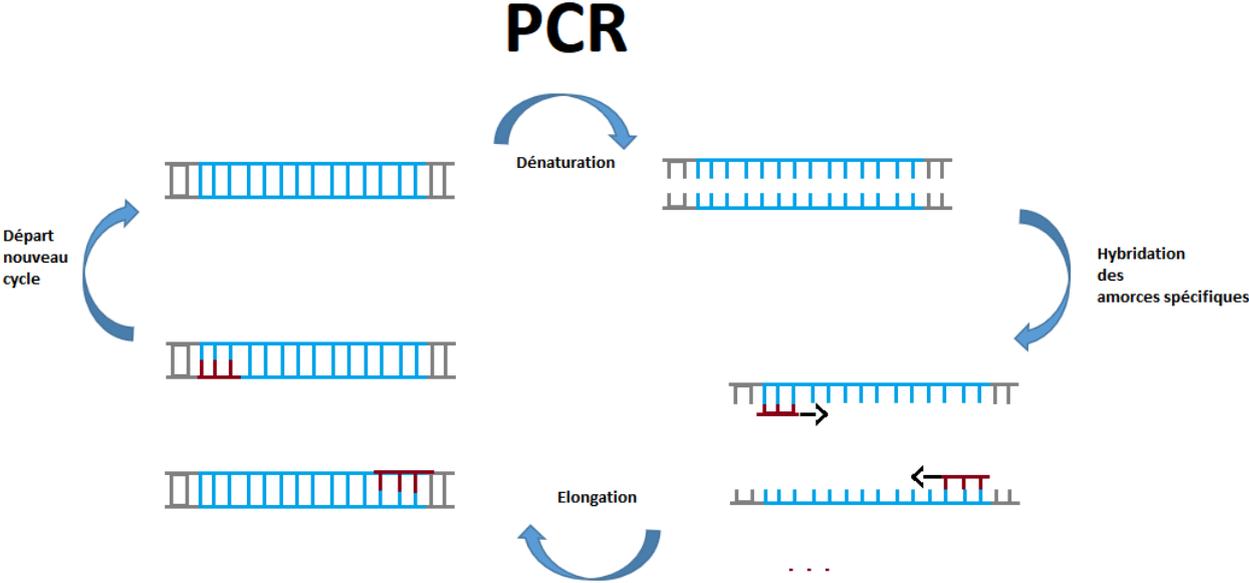
- A > Colonne vertébrale indétectable
- B > Couverture graisseuse dense
- C > Muscles très pleins
- E > Processus transverses indétectables



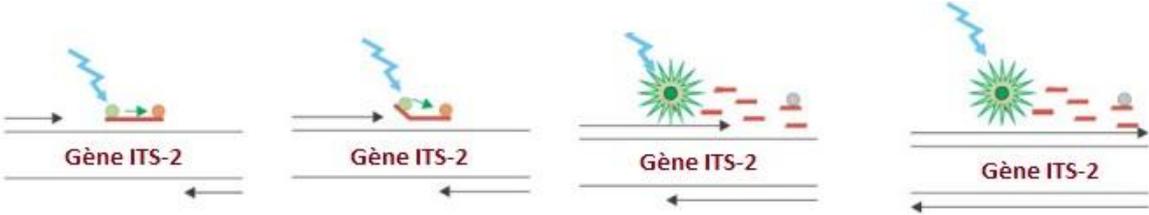
Annexe 2 : Clé de détermination des principaux strongles gastro-intestinaux chez les ovins, d'après Van Wyk, Mayhew 2013.



Annexe 3 : Principe de la technologie PCR.



Annexe 4 : Principe de la technologie TaqMan en qPCR.



Annexe 5 : Formules pour le calcul de l'IC95, à partir de la formule FECR₂.

- **Formule FECR₂ :**

$$FECR = 100 \left(1 - \frac{\overline{FEC}_t}{\overline{FEC}_c} \right)$$

Avec « t » le lot traité post traitement et « c » le lot contrôle post traitement. Cette formule est également utilisable avec les coprologies de mélange, avec les moyennes arithmétiques des FEC mélange.

- **Moyenne arithmétique des FEC :**

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

- **Variance d'un lot :**

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

- **Variance de réduction :**

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

Avec « t » le lot traité post traitement et « c » le 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 : Formules pour le calcul de l'IC95, à partir de la formule FE $\overline{C}R_1$ (Falzon et al. 2015).

- **Formule FE $\overline{C}R_1$**

$$FE\overline{C}R_1 = 100 \left(1 - \frac{\overline{FEC}_{t2}}{\overline{FEC}_{t1}} * \frac{\overline{FEC}_{c1}}{\overline{FEC}_{c2}} \right)$$

Avec t1 et c1, respectivement les lots traités et contrôlés à J0. Et avec t2 et c2 respectivement les lots traités et contrôlés à J14 (après traitement).

- **Covariance de c :**

$$COVAR_c = \frac{1}{\overline{FEC}_{c1} + 0.25} + \frac{1}{\overline{FEC}_{c2} + 0.25} + \frac{2 * R_c}{\sqrt{(\overline{FEC}_{c1} + 0.25) * (\overline{FEC}_{c2} + 0.25)}}$$

Avec R_c la corrélation entre le FEC prétraitement et le FEC post traitement du lot contrôle.

- **Covariance de t :**

$$COVAR_t = \frac{1}{\overline{FEC}_{t1} + 0.25} + \frac{1}{\overline{FEC}_{t2} + 0.25} + \frac{2 * R_t}{\sqrt{(\overline{FEC}_{t1} + 0.25) * (\overline{FEC}_{t2} + 0.25)}}$$

Avec R_T la corrélation entre le FEC prétraitement et le FEC post traitement du lot traité.

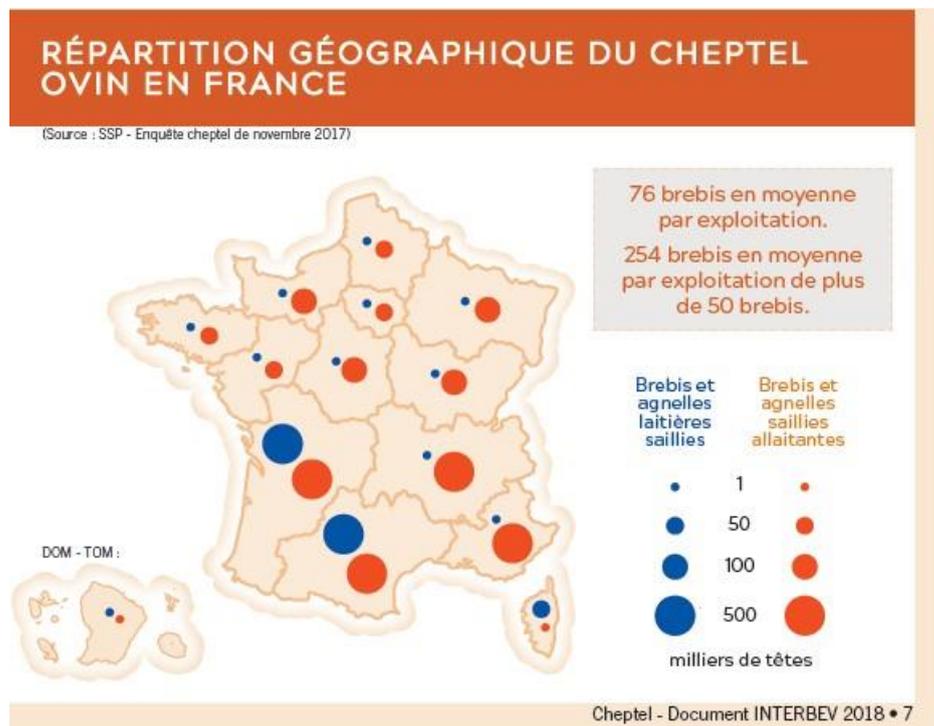
- **Borne inférieure de l'IC 95% :**

$$100 \left[1 - \frac{\overline{FEC}_{t2}}{\overline{FEC}_{t1}} * \frac{\overline{FEC}_{c1}}{\overline{FEC}_{c2}} * e^{\left(\sqrt{(\overline{COVAR}_c + \overline{COVAR}_t)} * 1.96 \right)} \right]$$

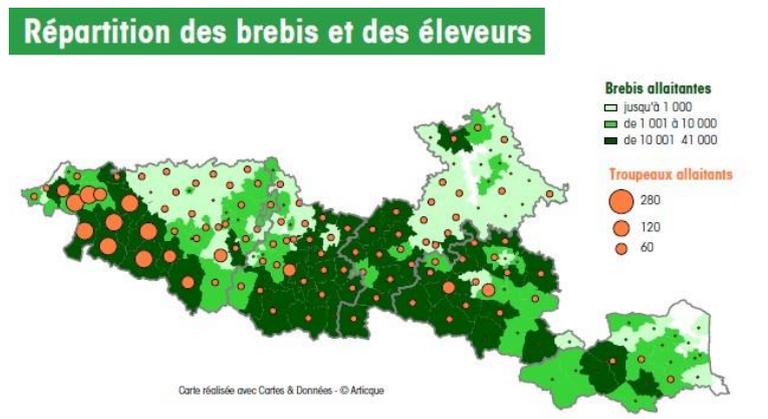
- **Borne supérieure de l'IC 95% :**

$$100 \left[1 - \frac{\overline{FEC}_{t2}}{\overline{FEC}_{t1}} * \frac{\overline{FEC}_{c1}}{\overline{FEC}_{c2}} / e^{\left(\sqrt{(\overline{COVAR}_c + \overline{COVAR}_t)} * 1.96 \right)} \right]$$

Annexe 7 : Répartition géographique du cheptel ovin en France.



Annexe 8 : Répartition des brebis et des éleveurs allaitants au sein de la zone Pyrénéenne.



Annexe 9 : Relevé météorologique de la station Tarbes – Lourdes – Ossun, sur la période estivale 2019.

	Moyenne T° sur la journée	T° minimale sur le mois	T° maximale sur le mois	Précipitations (mm)
Juin 2019	12.6 – 24.5 °C	6 °C	35.8 °C	61.3 mm
Juillet 2019	16.5 – 27.3 °C	10.7 °C	37.7 °C	70.7 mm
Août 2019	15.6 – 26.3 °C	9.4 °C	33.7 °C	83.7 mm

Annexe 10 : Exemple d'un tableau de répartition de brebis au sein des différents lots, réalisé lors d'une visite JO.

NOM ELEVAGE : XXXXXXXXXX DATE : 30/09/19

Témoin	Panacur	Oramec	Cydecitine	Séponver	Lévamisole	Zolvic
Bleu	Vent	ORANGE	Violet	/	Noir	/
35038 35011 35034 35065 35003 20038 40114 35011 85001 50050 50068	35067 35061 35058 35075 75051 20133 30046 30021 30071 85021	90015 30072 75106 60210 40116 85031 75034 85044 60147 30032	85002 20080 40028 40111 50044 60163 35022 75041 20036 50014		35046 40022 35078 30060 80002 50012 75027 85087 35060 50066	
	2 ml / 10kg 16 ml	2,5 ml / 10kg 20 ml	1 ml / 5kg 16 ml	1 ml / 5 kg 16 ml	10 ml / 50kg 16 ml	1 ml / 10kg 8 ml

PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN AVEC LE KIT POWERSOIL®

Le port des gants est recommandé pour la totalité des manipulations.

- Décongeler l'échantillon à extraire. **Ajouter 500µL d'échantillon** dans des **tubes PowerBead** (ou le volume nécessaire pour 500 larves) ou **100 mg de matières fécales** congelées (noter la masse pesée exactement)
 En parallèle avec l'échantillon à extraire, bien suivre le même protocole pour un échantillon négatif. Cet échantillon pourra être de l'eau distillée stérile
- **Ajouter 60µL de C1**. Si C1 est précipité, chauffer entre les mains jusqu'à dissolution complète
- Vortexer horizontalement les tubes PowerBead pendant 10 min (si + de 12 préparations ajouter 5-10min) sur force maximum
- Centrifuger à 10.000xg pendant 1 minute
Astuce : lorsque l'on centrifuge bien mettre la languette du bouchon vers l'extérieur afin de savoir où se trouve le culot
- Prélever 500µL de surnageant et le mettre dans **des tubes Collection**.
 Ne pas toucher les billes lorsque l'on prélève le surnageant
- **Ajouter 250µL de C2**. Vortexer
- Incuber à 4°C pendant 5min
- Centrifuger à 10.000xg pendant 1min
- Prélever 600µL de surnageant et déposer dans des **tubes Collection neufs**.
- **Ajouter 200µL de C3**. Vortexer brièvement
- Incuber à 4°C pendant 5min
- Centrifuger à 10.000xg pendant 1min
- Prélever max 750µL de surnageant (prendre un peu moins afin de ne pas toucher le culot) et déposer dans **tubes Collection neufs**
- **Secouer C4. Ajouter 1200µL (ie 2* 600 µL) de C4**

- Prélever 650µL et placer dans des **tubes Spin Filter**
- Centrifuger à 10.000xg pendant 1min
- Jeter le liquide
- Jeter le liquide qui est passé à travers la membrane

Répéter encore 2 fois (jusqu'à épuisement de solution dans les tubes Collection). Garder les mêmes tubes Spin Filter tout le long de cette étape

- Lors du dernier passage bien jeter le liquide qui est passé à travers la membrane avant de passer à l'étape suivante
- **Ajouter 500µL de C5**
- Centrifuger à 10.000xg pendant 1 minute
- Jeter le liquide qui est passé à travers la membrane
- Centrifuger à 10.000xg pendant 1min
- Placer le filtre dans un **tube Collection neuf**
- **Ajouter 100µL de C6** au centre de la membrane blanche
- Centrifuger à 10.000xg pendant 1 minute
- Jeter la colonne (garder le tube et la solution)

Annexe 12 : Détail des sondes et amorces utilisées, d'après Milhes et al, 2017.

	H. contortus	T. circumcincta	T. colubriformis
Amorce F	CA + TATACATGCAAC + G (T _m = 54 °C)	+CAGTT + CAAGAATAA + C (T _m = 51 °C)	AATGGT + CATTRTCAA + A (T _m = 53 °C)
Sonde P	TGACATGTATGGCGACGAT	CCGTCGTAACGTTCCCTGAAT	CCTGTATGATGTGAACGTGT
NCR	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT (T _m = 54 °C)		

Annexe 13 : Exemple de plan de plaque.

Objectif : PCR Marie-Pierre et François

LE 24-06-19

1 - Elevage A

2- Elevage C

Plan de plaque

						GAMME PLASMIDE					
						7	8	9	10	11	12
A	1.1 Panacur J14	Elevage A	1.1 Panacur J14	Elevage A	1.1 Panacur J14	Elevage A	500	500	500	500	500
B	1.2 Seponver J14	Elevage A	1.2 Seponver J14	Elevage A	1.2 Seponver J14	Elevage A	250	250	250	250	250
C	1.3 Témoin J14	Elevage A	1.3 Témoin J14	Elevage A	1.3 Témoin J14	Elevage A	125	125	125	125	125
D	1.4 Témoin J0	Elevage A	1.4 Témoin J0	Elevage A	1.4 Témoin J0	Elevage A	62	62	62	62	62
E	2.1 Panacur J14	Elevage C	2.1 Panacur J14	Elevage C	2.1 Panacur J14	Elevage C	31	31	31	31	31
F	2.2 Temoin J14	Elevage C	2.2 Temoin J14	Elevage C	2.2 Temoin J14	Elevage C	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
G	2.3 Temoin J0	Elevage C	2.3 Temoin J0	Elevage C	2.3 Temoin J0	Elevage C	TNEG	TNEG	TNEG	TNEG	TNEG
H							TEXT 070119		TEXT 070119		TEXT 070119

mix seul

HEX
Cy5
FAM

Haemonchus
Teladorsagia
Trichostrongylus

Distribuer : 17,5 µL de Mix
2,5 µL d'ADN

échantillons (N)	14
Volume morts	2
Total	16

Mix HC : HCF-LNA / HCP
Mix Tela : TCF-LNA / TCP
Mix Tricho : TVF-LNA / TVP2

Préparation des Mix

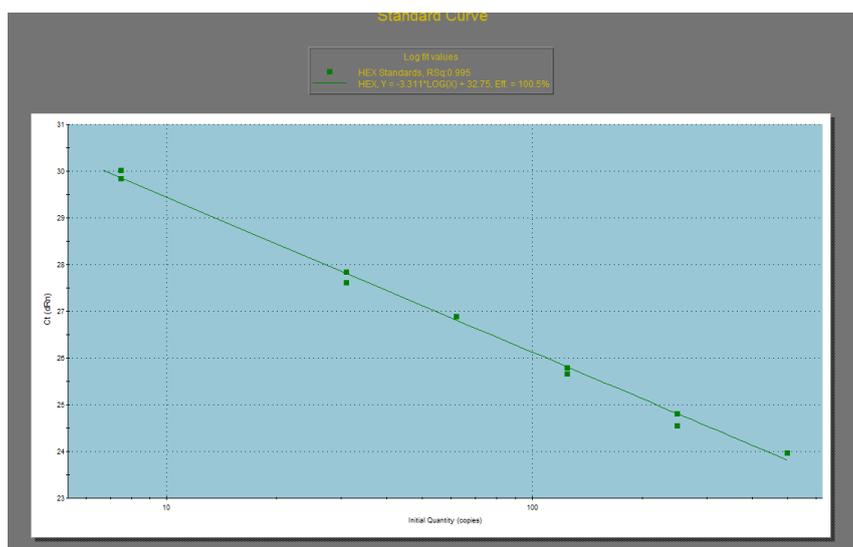
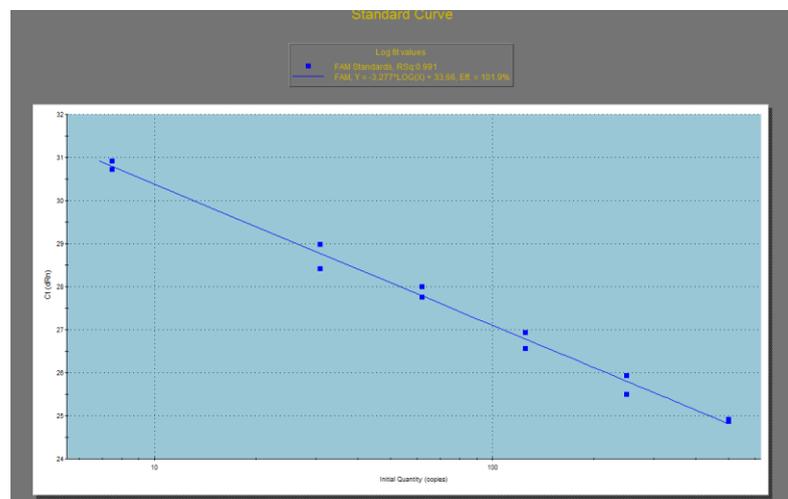
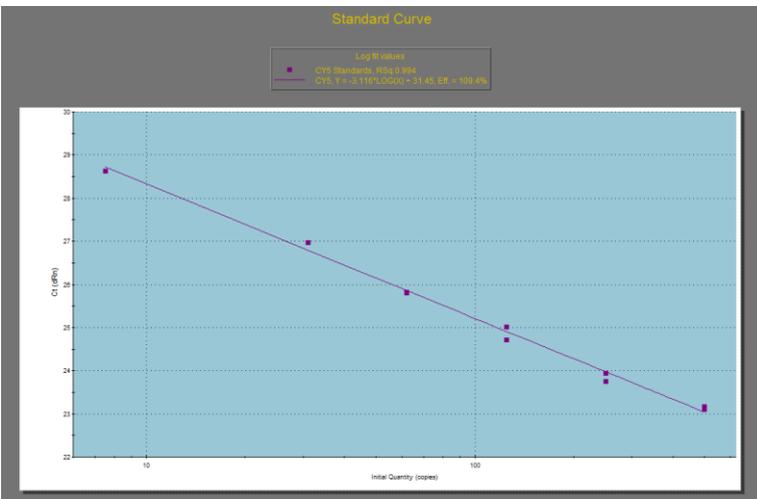
Réactifs	Quantité (µl)	Duplicat	N =
Master MIX	10	20	320
Eau BSA préparée le 12-07-18	5,5	11	176
Amorce F (10µM)	0,5	1	16
NCR (10µM)	0,5	1	16
Sonde P (2µM)	1	2	32
Total	17,5	35	560

Annexe 14 : Exemple de regroupement de différents élevages au sein différentes plaques.

Extraction 1		Extraction 2		Extraction 3		Extraction 4	
Plaque 1		plaque 2		plaque 3		plaque 5	
Elevage D		Elevage A		Elevage C		Elevage B	
Panacur J14	Panacur J14	Panacur J14	Panacur J14	Panacur J14	Panacur J14	Panacur J14	Panacur J14
Lévamisol J14	Cydoctine J14	Séponver J14	Oramec J14	Séponver J14	Oramec J14	Lévamisol J14	Lévamisol J14
Témoin J14	Seponver J14	Témoin J14	Seponver J14	Témoin J14	Seponver J14	Oramec J14	Oramec J14
Témoin J0	Témoin J14	Témoin J0	Témoin J14	Témoin J0	Témoin J14	Témoin J14	Témoin J14
	Témoin J0		Témoin J0		Témoin J0		Témoin J0

Elevage E		Elevage B'	
Panacur J14	Panacur J14	Panacur J14	Panacur J14
Seponver J14	Témoin J14	Témoin J14	Témoin J14
Témoin J14	Témoin J0	Témoin J0	Témoin J0
Témoin J0	Séponver J14	Séponver J14	Séponver J14

Annexe 15 : Courbes standards, respectivement concernant H. contortus, T. circumcincta et T. colubriformis, obtenues à l'issue d'une des PCR de l'étude.



Annexe 16 : Tableau récapitulatif par élevage de l'ensemble des résultats obtenus, au sein de l'estive des Hautes-Pyrénées.

		Molécules testées					Date de descente	Bilan
		Fenbendazole	Ivermectine	Moxidectine	Closantel	Lévamisole		
<u>Elevage A</u>	Molécules testées avant la montée	X	X	X	X	X	31 août	<p>Résistance confirmée : fenbendazole</p> <p>Dynamisme FECR : augmentation importante du nombre d'OPG après la descente</p> <p>Dynamisme des populations PCR :</p> <ul style="list-style-type: none"> Montée : lots témoins, dominance forte <i>T. circumcincta</i> (J0 = 69% et J14 = 88%), contre <i>H. contortus</i> (J0 = 28% et J14 = 11%) et <i>T. colubriformis</i> (J0 = 2% et J14 = 0%). <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>H. contortus</i> Descente : inversion nette, <i>H. contortus</i> dominant (79 et 89%), contre <i>T. circumcincta</i> (12 et 7%) et <i>T. colubriformis</i> (9 et 3%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : HC (95,8%), et <i>T. colubriformis</i> (4,2%)
	FECR	75%	100%	100%	Cf PCR	100%		
	Molécules testées après la descente	X	X	X	X	X		
	FECR	39%	100%	98%	Cf PCR	100%		
<u>Elevage B</u>	Molécules testées avant la montée	X	X	X		X	15 sept.	<p>Résistances confirmées : Fenbendazole et Lévamisole</p> <p>Résistance potentielle, uniquement après la descente : Ivermectine</p> <p>Dynamisme des populations PCR :</p> <ul style="list-style-type: none"> Montée : lots témoins, dominance nette <i>T. colubriformis</i>. (79 et 98%), contre <i>H. contortus</i> (21 et 0%) et <i>T. circumcincta</i> (0 et 2,3%). <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>T. colubriformis</i> (69,2%), <i>H. contortus</i> (29,4%), et <i>T. circumcincta</i> (1,4%) <u>Espèces résistantes lévamisole</u> : <i>T. circumcincta</i> (70%) et <i>T. colubriformis</i> (30%)
	FECR	5%	100%	95%		100%		
	Molécules testées après la descente	X	X	X		X		
	FECR	-33%	88%	100%		96%		

							<ul style="list-style-type: none"> Descente : lots témoins, inversion avec majorité <i>H. contortus</i> (75 et 94%) contre <i>T. circumcincta</i> (3,5 et 2,5%) et <i>T. colubriformis</i> (22 et 6%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>H. contortus</i> (99,8%), et <i>T. colubriformis</i> (0,2%) <u>Espèces résistantes lévamisole</u> : <i>H. contortus</i> (88,5) et <i>T. circumcincta</i> (11,5%) <u>Espèces résistantes ivermectine</u> : <i>H. contortus</i> (100%) 	
Elevage <u>C</u>	Molécules testées avant la montée	X					26 août	Résistances confirmées : Fenbendazole Dynamisme FECR : augmentation du nombre d'OPG après la descente Dynamisme des populations PCR : <ul style="list-style-type: none"> Montée : lots témoins, dominance nette <i>T. colubriformis</i> (86 et 89%), contre <i>T. circumcincta</i> (8 et 9%) puis <i>H. contortus</i> (5 et 2%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>T. colubriformis</i> (98,1%), et <i>H. contortus</i> (1%) Descente : lots témoins, remontée d'<i>H. contortus</i> (25 et 28%) mais dominance <i>T. colubriformis</i> (71 et 68%), puis <i>T. circumcincta</i> (3 et 4%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>T. colubriformis</i> (78,7%) , et <i>H. contortus</i> (20,7%),
	FECR	32%						
	Molécules testées après la descente	X		X	X			
	FECR	76%		100%	Cf PCR			
Elevage <u>D</u>	Molécules testées avant la montée	X					?	Résistances confirmées : Fenbendazole Résistance observée à la descente mais non évaluée montée : Lévamisole Dynamisme FECR : augmentation du nombre d'OPG après la descente Dynamisme des populations PCR :
	FECR	35%						
	Molécules testées après la	X		X		X		

	descente						<ul style="list-style-type: none"> Montée : lots témoins, dominance nette <i>T. colubriformis</i> (62 et 32%), contre <i>H. contortus</i> (35 et 61%) et <i>T. circumcincta</i> (3 et 7%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>T. colubriformis</i> (88,3%), et <i>H. contortus</i> (10.7%), Descente : lots témoins, remontée d'<i>H. contortus</i> (13 et 43%) mais dominance <i>T. colubriformis</i> (68 et 46%), puis <i>T. circumcincta</i> (20 et 11%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>T. colubriformis</i> (74%), et <i>H. contortus</i> (25,8%), <u>Suspicion espèces résistantes lévamisole</u> : <i>T. colubriformis</i> (50%), <i>T. circumcincta</i> (33%) et <i>H. contortus</i> (17%)
	FECR	71%		100%		93%	
<u>Elevage</u> <u>E</u>	Molécules testées avant la montée	X	X	X	X	15-22 sept.	Résistances confirmées : Fenbendazole Dynamisme FECR : augmentation du nombre d'OPG après la descente Dynamisme des populations PCR : <ul style="list-style-type: none"> Montée : lots témoins, pas de dominance nette, <i>H. contortus</i> (1 et 54%), <i>T. circumcincta</i> (90 et 3%), <i>T. colubriformis</i> (9 et 43%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>T. colubriformis</i> (100%) Descente : lots témoins, pas de dominance nette, <i>H. contortus</i> (5 et 29%), <i>T. circumcincta</i> (3 et 36%), <i>T. colubriformis</i> (92 et 35%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>H. contortus</i> (97,3%), et <i>T. colubriformis</i> (2,5%)
	FECR	0%	100%	100%	Cf PCR		
	Molécules testées après la descente	X	X	X	X		
	FECR	28%	100%	100%	Cf PCR		
<u>Elevage</u> <u>E</u>	Molécules testées avant la montée	X	X	X	X	20 août	Résistances confirmées : Fenbendazole et Ivermectine Dynamisme FECR : augmentation du nombre d'OPG après la descente Dynamisme des populations PCR :
	FECR	75%	85%	100%	Cf PCR		

	Molécules testées après la descente	X	X	X	X			<ul style="list-style-type: none"> Montée : lots témoins, dominance nette de <i>T. colubriformis</i> (100 et 92,3%), contre <i>H. contortus</i> (0%) et <i>T. circumcincta</i> (0 et 8%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : non détecté PCR (1 seul œuf à la coproscopie) <u>Espèces résistantes ivermectine</u> : <i>H. contortus</i> (100%) Descente : lots témoins, dominance nette de <i>H. contortus</i> (94 et 90%), contre <i>T. colubriformis</i> (5 et 10%) et <i>T. circumcincta</i> (1 et 0%) <u>Espèces résistantes fenbendazole</u> : <i>H. contortus</i> (86.3%), et <i>T. colubriformis</i> (13,6%) <u>Espèces résistantes ivermectine</u> : <i>H. contortus</i> (100%)
	FECR	45%	95%	100%	Cf PCR			

Annexe 17 : Tableau récapitulatif par élevage de l'ensemble des résultats obtenus, au sein de l'estive Ariégeoise.

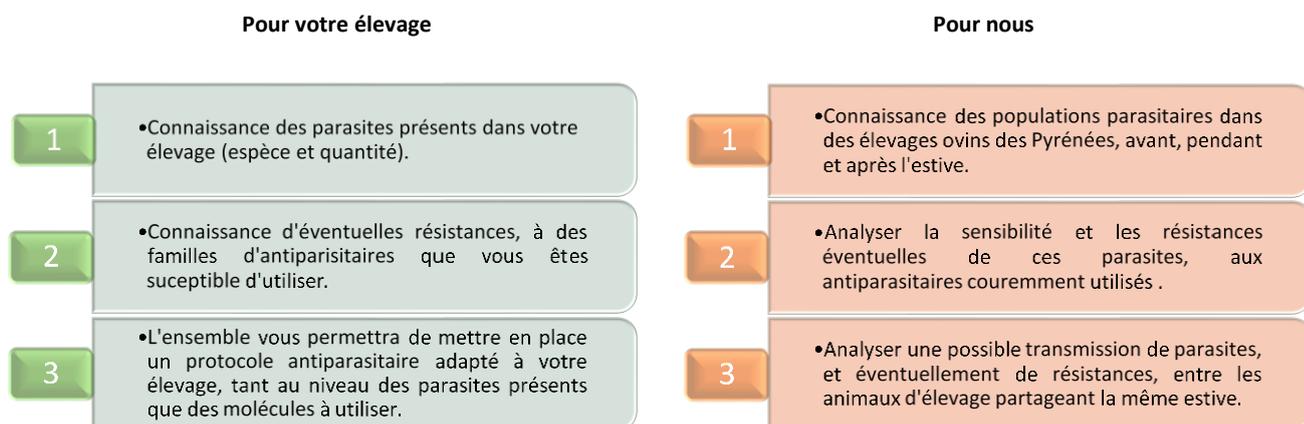
		Molécules testées				Bilan
		Fenbendazole	Ivermectine	Moxidectine	Closantel	
<u>Elevage A'</u>	Molécules testées avant la montée	X	X	X	X	<p>Résistance confirmée : Fenbendazole</p> <p>Résistance suspectée : Ivermectine</p> <p>Parasites présents en élevage : dominance d'<i>H. contortus</i> (58% et 56.9%) et de <i>T. colubriformis</i> (40.6% et 42.4%) par rapport à <i>T. circumcincta</i> (1.4% et 0.7%)</p> <p><u>Parasites résistants</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> Fenbendazole : <i>H. contortus</i> (95.9%) <i>T. colubriformis</i> (3.8%) et <i>T. circumcincta</i> (0.2%) Ivermectine : <i>H. contortus</i> (96%) et <i>T. colubriformis</i> (4%)
	FECR	70%	97%	100%	Cf PCR	
<u>Elevage B'</u>	Molécules testées avant la montée	X	X	X	X	<p>Résistance confirmée : Fenbendazole</p> <p>Résistances suspectées : Ivermectine et Moxidectine</p> <p>Dynamisme des populations PCR :</p> <ul style="list-style-type: none"> Montée : dominance <i>H. contortus</i> . (95.1% et 40.8%), contre <i>T. colubriformis</i> (0% et 59.2%) et <i>T. circumcincta</i> . (4.9% et 0%). <u>Espèces résistantes Fenbendazole</u> : <i>H. contortus</i> (96.8%) et <i>T. colubriformis</i> . (3.2%) <u>Espèce résistante Ivermectine</u> : <i>T. circumcincta</i> (100%) <u>Espèce résistante Moxidectine</u> : <i>H. contortus</i> (100%) Descente : Toujours dominance d'<i>H. contortus</i> (46.1 et 76.5%) contre <i>T. circumcincta</i> (13.7% et 15.1%) et <i>T. colubriformis</i> (40.2% et 8.4%) <u>Espèces résistantes Fenbendazole</u> : <i>T. colubriformis</i> (71.1%), et <i>H. contortus</i> (28.9%)
	FECR	60%	80%%	80%%	Cf PCR	
	Descente	X	X	X	X	
	FECR	50%	100%	100%	Cf PCR	

<u>Elevage C'</u>	Molécules testées avant la montée	X	X	X	X	Résistance confirmée : Fenbendazole Parasites présents en élevage : dominance d' <i>H. contortus</i> (36.4% et 91.7%) par rapport à <i>T. circumcincta</i> (63.6% et 0%) et <i>T. colubriformis</i> (0% et 8.3%)
	FECR	67%	100%	100%	Cf PCR	<u>Parasites résistants</u> : <ul style="list-style-type: none"> Fenbendazole : <i>T. colubriformis</i> (56.8%), <i>T. circumcincta</i> (22.1%) et <i>H. contortus</i> (21.1%)
<u>Elevage D'</u>	Molécules testées après la descente	X	X	X	X	Résistance confirmée : Fenbendazole Parasites présents en élevage : dominance de <i>T. colubriformis</i> (78.8% et 72.6%) par rapport à <i>T. circumcincta</i> (16.1% et 20.8%) et <i>H. contortus</i> (5.1% et 6.6%)
	FECR	56%	100%	100%	Cf PCR	<u>Parasites résistants</u> : <ul style="list-style-type: none"> Fenbendazole : <i>T. colubriformis</i> (91.8%) <i>T. circumcincta</i> (4.6%) et <i>H. contortus</i> (3.6%)
<u>Elevage E'</u>	Molécules testées après la descente	X				Résistance confirmée : Fenbendazole Parasites présents en élevage : dominance de <i>T. colubriformis</i> (90% et 88.5%) par rapport à <i>T. circumcincta</i> (10% et 11.5%) et absence d' <i>H. contortus</i>
	FECR	67%				<u>Parasites résistants</u> : <ul style="list-style-type: none"> Fenbendazole : <i>T. colubriformis</i> (100%)

Projet de thèse Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Date du projet : **Mai 2019 – Octobre 2019**

But du projet : **Analyser la population parasitaire, et les éventuelles résistances associées, sur des ovins avant, pendant et après l'estive.**

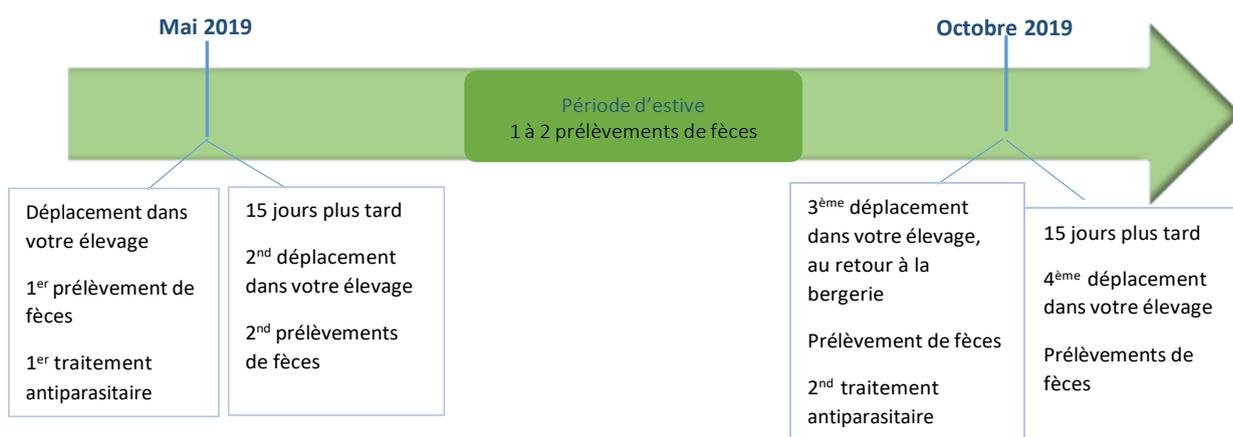


En pratique, comment ça se passe ?

Nous avons besoin de faire **5 lots, d'une dizaine d'animaux chacun**. Sur chaque animal, plusieurs prélèvements de fèces seront faits au cours du projet (sans aucune conséquence pour l'animal). Ces prélèvements seront envoyés à l'école où nous les analyserons.

Lors de la 1^{ère} visite, 4 des 5 lots seront traités avec une molécule antiparasitaire différente, le dernier lot servira de témoin, il ne recevra aucun traitement (chaque lot sera marqué d'une couleur). Une seconde visite sera effectuée 14 jours après pour reprélever les 5 lots d'animaux. Nous aurons besoin de faire ces deux visites 2 fois (mai et octobre), ce qui vous imposera au total **4 visites, de deux heures environ**. Les prélèvements dans l'estive (1 ou 2) seront à notre charge.

Aucun préjudice ne sera fait aux animaux, et nous prenons en charge financièrement le coût des traitements !



Etudiants : COLLIGNON Marie-Pierre – COLLIOT François

Annexe 19 : Questionnaire à destination des éleveurs.

Bonjour et tout d'abord **merci** d'avoir participé à notre étude. Celle-ci touche à sa fin, et dans le but de pouvoir analyser au mieux nos résultats, pouvez-vous répondre à ce questionnaire, et nous le rendre dans 15 jours, lors de notre seconde visite ?

- Depuis combien de temps possédez-vous votre élevage et depuis combien de temps participez-vous à cette estive ?

- Combien d'animaux compte-t-il à l'heure actuelle ?

- Pouvez-vous nous décrire votre fonctionnement quant à la rentrée à la bergerie et à la sortie à l'herbe des brebis ? (à quelle période les faites-vous rentrer et sortir...)

- Quel est votre protocole de vermifugation habituel ? (nombre de traitement/an ; période de traitement, produits généralement utilisés)

- Pouvez-vous nous décrire brièvement l'alimentation de vos brebis à la bergerie ? leur donnez-vous des compléments lorsqu'elles sont à l'herbe ?

Annexe 20: Exemple de fiche bilan transmise aux élevages à la fin de l'étude, ici exemple élevage B'.

Etude du dynamisme de populations de strongles digestifs et de leurs résistances aux anthelminthiques dans deux estives ovines Pyrénéennes

M. XXX,

Tout d'abord, nous souhaitons vous remercier pour votre participation, sans laquelle nous n'aurions pas pu mener ce projet à bien. **Et surtout merci d'avoir joué le jeu jusqu'au bout avec nous**, avec votre bonne humeur. Nous vous proposons maintenant un bilan personnalisé pour votre élevage.

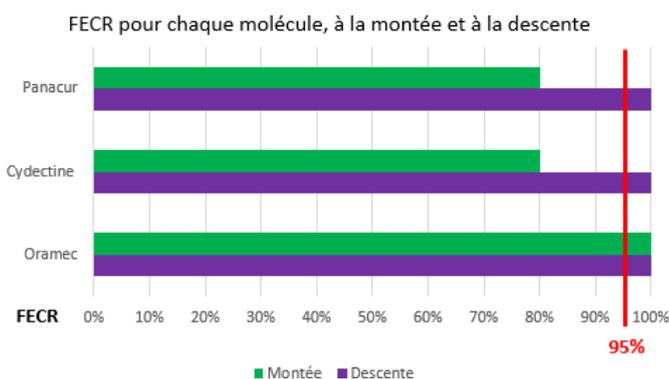
I. Situation générale à la montée et à la descente

	Montée	Descente
Résultat de la coproscopie du témoin, en œufs par gramme (OPG),	975 strongles, 350 petites douves	325 strongles, 150 petites douves, 50 trichures
% <i>Haemonchus contortus</i>	67.9	61.3
% <i>Teladorsagia circumcincta</i>	2.45	14.4
% <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	29.65	24.3

Rq : les % sont issus des PCR, suite à une coproculture.

- ⇒ Le nombre de strongles à la montée n'est pas négligeable, mais on note une diminution nette de celui-ci après l'estive. Il sera important de tenir compte de la petite douve dans vos traitements, éventuellement à l'aide d'analyse coprologique pour vous orienter sur les parasites à cibler.
- ⇒ Que ce soit à la montée ou à la descente, *Haemonchus contortus* est le strongle dominant dans l'élevage.

II. Efficacité de l'arsenal thérapeutique



FECR : taux de réduction d'excrétion des œufs, on considère qu'il y a une résistance en dessous de 95%.

- ⇒ Présence d'une résistance, confirmée à la descente, pour le Panacur®. Des suspicions avaient émergé à la montée concernant l'Oramec® et la Cydectine®, mais avec un très faible nombre de parasites résistants détectés. Ces suspicions n'ont pas été confirmées à la descente.

Rq : Le Seponver, qui a pourtant était testé chez vous, n'est pas présent sur ce graphique car il n'est efficace que contre *H. contortus*, le FECR est donc faussé pour cette molécule.

III. Les espèces résistantes.

Spécialité (molécule)	Panacur [®] (fenbendazole)		Oramec [®] (lévamisol)		Cydectine [®] (moxidectine)	
	Montée	Descente	Montée	Descente	Montée	Descente
<i>H. contortus</i>	Résistance, (96.8%*)	Résistance, (28.9%*)	Efficace	Efficace	Résistance, (100%*)	Efficace
<i>T. circumcincta</i>	Efficace	Efficace	Résistance, (100%*)	Non détecté	Efficace	Efficace
<i>T. colubiformis</i>	Résistance (3.2%*)	Résistance (71.1%*)	Efficace	Efficace	Efficace	Efficace

* Répartition en % entre les différents parasites

- ⇒ On peut noter une résistance au **Panacur[®]**, qui concerne que deux des trois espèces de strongles testés. Il convient donc de limiter l'utilisation des benzimidazoles (Panacur[®], Valbazen[®]...) pour traiter les strongles digestifs, et la conserver pour le traitement des douves.
- ⇒ A l'heure actuelle, la Cydectine[®], l'Oramec[®] et le Séponver[®] ne sont pas considérés comme ayant des résistances au sein de l'élevage.
- ⇒ Cependant, pour prévenir l'apparition de nouvelle résistance, il convient de traiter raisonnablement. Le traitement au cas par cas, comme vous le faites déjà, permet de limiter ces résistances. Nous vous conseillons cependant, l'utilisation d'exams coprologiques 1 à 2 fois par an, afin de capturer une image de la situation parasites de l'élevage. Ces exams pourraient éventuellement vous permettre d'adapter vos traitement.
- ⇒ Nous vous conseillons, dans le cas où vous auriez besoin de traiter plusieurs par an, de faire dans la mesure du possible, une rotation au cours de l'année sur les molécules que vous utiliserez (liste positive ci-dessus, à laquelle vous pourrez éventuellement rajouter le Lévamisol, non testé ici).
- ⇒ Enfin, pour limiter la contamination de vos animaux et vos pâtures, de continuer les rotations au niveau de vos pâture, et éviter le surpâturage.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné, JACQUIET Philippe, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse commune de COLLIGNON Marie-Pierre et COLLIOT François intitulée « Dynamique des résistances aux anthelminthiques chez les strongles gastro-intestinaux dans deux estives ovines pyrénéennes » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

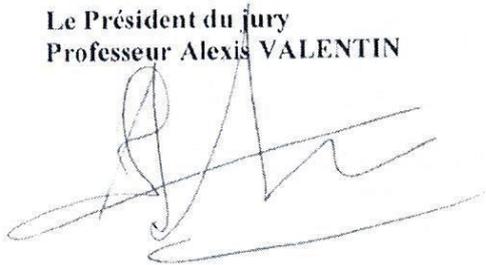
Fait à Toulouse, le 01/06/2021
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Philippe JACQUIET



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu :
Le Président du jury
Professeur Alexis VALENTIN



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul
Sabatier
Monsieur Jean-Marc BROTO
Par délégation, le Doyen de la faculté de
Médecine de Toulouse-Rangueil
Monsieur Elie SERRANO



Mme COLLIGNON Marie-Pierre et M. COLLIOT François
Ont été admis sur concours en : 2016
Ont obtenu leur diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 06/07/2020
Ont validé leur année d'approfondissement le : 06/05/2021
N'ont plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

NOMS : COLLIGNON Marie-Pierre et COLLIOT François

TITRE : DYNAMIQUE DES RESISTANCES AUX ANTHELMINTHIQUES DES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX DANS DEUX ESTIVES OVINES PYRENEENNES.

RESUME : le test de réduction de l'excrétion fécale (FECRT) a été utilisé pour évaluer la présence de résistances aux anthelminthiques, dans 6 élevages composant une estive des Hautes-Pyrénées, avant la montée et après la descente des animaux de la zone d'estive. Un protocole similaire a été mis en place au sein de 5 élevages, composant une estive en Ariège. Cependant dans ce cas la dynamique des résistances n'a pas pu être étudiée. Dans ces élevages, selon le nombre d'animaux disponibles, 1 à 6 molécules ont été testées : le fenbendazole, le lévamisole, l'ivermectine, la moxidectine, le monépantel et le closantel. Des coprocultures et une identification des larves obtenues par qPCR ont été réalisées. Au sein de tous les élevages, une résistance au fenbendazole a été mise en évidence. Pour 10 élevages des 11 élevages participants, elle concernait *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*. Le lévamisole, l'ivermectine et la moxidectine, semblent encore globalement efficaces, bien que pour chacune d'elles, des élevages montrant une perte d'efficacité aient été détectés. Le closantel et le monepantel n'ont pas montré de résistances. Il semblerait qu'une population de *H. contortus* résistante à l'ivermectine ait pu être transmise entre deux élevages des Hautes-Pyrénées, au cours de l'estive.

MOTS-CLES : STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX, NEMATODES, OVINS, ANTHELMINTHIQUE, RESISTANCE, FENBENDAZOLE, LEVAMISOLE, IVERMECTINE, MOXIDECTINE, MONEPANTEL, CLOSANTEL, COPROSCOPIE MELANGE, ESTIVE, PCR, HAUTES-PYRENEES, ARIEGE.

TITLE : DYNAMIC AND ANTHELMINTHIC RESISTANCE OF GASTROINTESTINAL NEMATODES IN TWO OVINE SUMMER PASTURES IN THE PYRENEES

ABSTRACT : Using the Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT), anthelmintic resistance was evaluated in six meat sheep farms forming a summer pasture in Hautes-Pyrénées, before the climb and after the descent. A similar study was conducted in five meat sheep farms forming a summer pasture in Ariège. Nevertheless in this case the dynamics of resistance wasn't able to be studied in this summer pasture. In these farms, depending on the number of animals available, one to six molecules were tested: fenbendazole, levamisole, ivermectin, moxidectin, monepantel and closantel. Coprocultures and larvae's identification obtained by qPCR were carried out. In every farm, resistance to fenbendazole was highlighted and for 10 out of 11 farms, resistance concerned *H. contortus*, *T. circumcincta* and *T. colubriformis*. Levamisole, ivermectin and moxidectin seem still effective although that, for each molecule, some farms with efficiency loss were found. No resistance to closantel and monepantel was found. It seemed that ivermectin-resistant *H. contortus* population could have been transmitted between two farms in Hautes-Pyrénées during the summer pasture.

KEY WORDS : GASTROINTESTINAL NEMATODES, STRONGYLID, SHEEP, ANTHELMINTHIC, RESISTANCE, FENBENDAZOLE, LEVAMISOLE, IVERMECTIN, MOXIDECTIN, MONEPANTEL, CLOSANTEL, FAECAL EGG COUNT REDUCTION TEST (FECRT), COPROLOGY, PCR, HAUTES-PYRENEES, ARIEGE.