

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2023 - Thèse n° 030

**ETUDE IN VITRO DES RESISTANCES DES
STRONGLES DIGESTIFS DES CAPRINS AUX
ANTIPARASITAIRES EN AUVERGNE RHONE ALPES**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 6 juillet 2023
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

TRINDER Justine

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2023 - Thèse n° 030

**ETUDE IN VITRO DES RESISTANCES DES
STRONGLES DIGESTIFS DES CAPRINS AUX
ANTIPARASITAIRES EN AUVERGNE RHONE
THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 6 juillet 2023
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

TRINDER Justine

Liste des enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (20-03-2023)

Pr	ABITBOL	Marie	Professeur
Dr	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Pr	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Dr	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Pr	BECKER	Claire	Professeur
Dr	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Dr	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
Pr	BENOIT	Etienne	Professeur
Pr	BERNY	Philippe	Professeur
Pr	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
Dr	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
Dr	BRUTO	Maxime	Maître de conférences
Dr	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
Pr	BUFF	Samuel	Professeur
Pr	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
Dr	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
Pr	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Pr	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
Pr	CHABANNE	Luc	Professeur
Pr	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
Dr	CHANOIT	Gillaume	Professeur
Dr	CHETOT	Thomas	Maître de conférences
Pr	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Professeur
Pr	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Pr	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Dr	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
Dr	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
Dr	GALIA	Wessam	Maître de conférences
Pr	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
Dr	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Dr	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Dr	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Dr	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	JUNOT	Stéphane	Professeur
Pr	KODJO	Angeli	Professeur
Dr	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Dr	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Dr	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Pr	LE GRAND	Dominique	Professeur
Pr	LEBLOND	Agnès	Professeur
Dr	LEDOUX	Dorothee	Maître de conférences
Dr	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Dr	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
Dr	LEGROS	Vincent	Maître de conférences
Pr	LEPAGE	Olivier	Professeur
Pr	LOUZIER	Vanessa	Professeur
Dr	LURIER	Thibaut	Maître de conférences
Dr	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences
Pr	MARCHAL	Thierry	Professeur
Dr	MOSCA	Marion	Maître de conférences
Pr	MOUNIER	Luc	Professeur
Dr	PEROZ	Carole	Maître de conférences
Pr	PIN	Didier	Professeur
Pr	PONCE	Frédérique	Professeur
Pr	PORTIER	Karine	Professeur
Pr	POUZOT-NEVORET	Céline	Professeur
Pr	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Pr	REMY	Denise	Professeur
Dr	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
Pr	ROGER	Thierry	Professeur
Dr	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
Pr	SCHRAMME	Michael	Professeur
Pr	SERGENTET	Delphine	Professeur
Dr	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Dr	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
Dr	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	ZENNER	Lionel	Professeur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Bernard ALLAOUCHICHE

De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de Médecine de Lyon,

Qui me fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,

Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Gilles BOURGOIN

De VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon,

Pour son accompagnement, son investissement et son soutien.

Remerciements affectueux.

A Monsieur le Professeur Lionel ZENNER

De VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon,

Qui me fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse,

Sincères remerciements.

Table des matières

Table des annexes	11
Table des figures.....	13
Table des tableaux.....	15
Liste des abréviations	17
Introduction.....	19
1ère partie : Etude bibliographique	22
I. Les strongles gastro-intestinaux des petits ruminants.....	23
A. Généralités.....	23
1) Classification	23
2) Morphologie	24
i. Morphologie générale	24
ii. Morphologie détaillée.....	25
3) Reproduction	27
B. Cycle évolutif	28
C. Facteurs de survie.....	30
D. Pathogénicité	31
1) Phénomènes physiopathologiques	31
2) Signes cliniques.....	32
3) Immunité	34
E. Diagnostic	35
1) Examen clinique.....	35
2) Examens complémentaires.....	36
3) Identification des espèces de strongles gastro-intestinaux	39
4) Collection de données	39
II. Les anthelminthiques : contrôle du parasitisme mais origine de la problématique des résistances	40
A. Les anthelmintiques.....	40
1) Les benzimidazoles et pro-benzimidazoles.....	40
1) Endectocides.....	41
2) Imidazothiazoles (et tétrahydropyrimidines).....	42
3) Salicylanilidés	42
4) Les dérivés d'aminocétonitrile (AAD).....	42
B. Etat des lieux de la résistance.....	43

1) Définition de la résistance	43
2) Etat des lieux de la résistance dans le monde et en Europe	43
3) Etat des lieux de la résistance en France	44
4) Influence de la voie d'administration sur l'efficacité des traitements et le risque de développement des résistances	47
C. Résistances aux antiparasitaires	48
2) Facteurs de risque d'apparition des résistances	49
D. Méthodes d'évaluation des résistances chez les strongles gastro-intestinaux.....	51
1) Infestations expérimentales	51
2) Le test de réduction d'excrétion fécale (FECRT)	51
3) Tests <i>in vitro</i>	53
4) Tests moléculaires	54
III. Solutions alternatives et/ou complémentaires aux traitements anthelmintiques dans la maîtrise du parasitisme par les strongles gastro-intestinaux	55
A. Exemples de bonnes pratiques à adopter	55
1) Gestion raisonnée du pâturage	56
2) Conseils d'usage des antiparasitaires	57
i. Importance du maintien de populations refuges.....	57
ii. Dosage et voie d'administration.....	59
iii. Association ou alternance de molécules	59
B. Le zéro-pâturage.....	60
C. Contrôle des parasites sur la pâture avec des champignons nématophages	60
D. Action anthelmintique des plantes à tannins	61
E. Sélection d'animaux génétiquement résistants.....	62
F. Application par les éleveurs... ou pas.....	63
Partie 2 : Etude des résistances dans les élevages caprins en région Auvergne-Rhône-Alpes à l'aide de tests <i>in vitro</i>.....	64
I. Matériel et méthode	65
A. Sélection des élevages.....	65
B. Prélèvements et coproscopies.....	66
C. Extraction des œufs de strongles gastro-intestinaux.....	67
D. Préparation des solutions d'anthelmintiques.....	69
E. Test de développement larvaire	71
F. Correction des données	74
G. Classification de la sensibilité des strongles	74

II. Résultats et interprétation	75
A. Comptage et mise en forme des résultats.....	75
B. Résultats de LDA	76
1) Thiabendazole.....	76
2) Lévamisole	77
3) Eprinomectine	78
III. Discussion	79
A. Prélèvements de fèces et coproscopies	80
B. Extraction des œufs de strongles gastro-intestinaux.....	80
C. Préparation des solutions d'anthelminthiques	81
D. Test de développement larvaire.....	82
1) Paramètres du milieu de culture	82
2) Résultats du test de développement larvaire	84
3) Interprétation	85
E. Conséquences de cette étude sur les habitudes.....	87
F. Perspectives de l'étude	87
Conclusion	91
Bibliographie.....	93
Annexes	107

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Méthodologie de la dilution de la solution d'ivermectine.....	107
ANNEXE 2 : Méthodologie de la dilution de la solution de thiabendazole	108
ANNEXE 3 : Méthodologie de la dilution de la solution de lévamisole.....	109
ANNEXE 4 : Préparation des solutions de Earle, Escherichia Coli et d'amphotéricine	110
ANNEXE 5 : Comptage des larves mortes et vivantes sur le répliquat du thiabendazole.....	111
ANNEXE 6 : Résultats de développement larvaire dans le thiabendazole	112
ANNEXE 7 : Résultats de développement larvaire dans le lévamisole.....	113
ANNEXE 8 : Résultats de développement larvaire dans l'éprinomectine	114

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des principaux genres de nématodes dans l'embranchement des nématodes	23
Figure 2 : Schéma général de coupes longitudinales de nématodes (Deplazes et al., 2016)	24
Figure 3 : Œufs de Trichostrongylus sp. (à gauche) et d'Haemonchus sp. (à droite) observés au microscope optique.....	36
Figure 4 : Schéma d'une cellule de Mac Master	37
Figure 5 : Solutions de saccharose de différentes densités (production personnelle).....	68
Figure 6 : Dépôt d'un gradient de saccharose dans un tube Falcon (production personnelle).....	69
Figure 7 : Schéma du plan de plaque de l'étude	71
Figure 8 : Photographie de L3 en fin de LDA (production personnelle).....	73
Figure 9 : Pourcentage de développement larvaire obtenus en présence de thiabendazole	76
Figure 10 : Pourcentage de développement larvaire obtenus en présence de lévamisole.....	77
Figure 11 : Pourcentage de développement larvaire obtenus en présence de l'éprinomectine	78

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Grille d'interprétation du nombre d'œufs obtenus en coproscopie	38
Tableau 2 : Posologie des benzimidazoles chez les caprins	41
Tableau 3 : Posologie de l'éprinomectine chez les caprins	42
Tableau 4 : Mécanismes génétiques de résistance des strongles aux antiparasitaires	49
Tableau 5 : Intervalles de concentrations en anthelmintiques testées dans différentes études chez les ovins	70
Tableau 6 : Valeurs de concentration en amphotéricine dans la littérature	72
Tableau 7 : Pourcentages de développement des œufs jusqu'au stade L3 dans quelques publications	74
Tableau 8 : Valeurs référencées de dose létale discriminante chez les ovins, en mg/mL	75
Tableau 9 : Résultats des coproscopies préalables	75

LISTE DES ABREVIATIONS

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

Cl. : Classe

Embr. : Embranchement

F. : Famille

FECRT : Fecal Excretion Count Reduction Test

IL : interleukine

L1 : larve de stade 1

L2 : larve de stade 2

L3 : larve de stade 3

LM : lactones macrocycliques

LDA : Larval Development Assay

NEC : Note d'Etat Corporel

sCl. : Sous-classe

O. : Ordre

Opg : œufs par gramme de fèces

SF. : Super-famille

sF. : Sous-famille

INTRODUCTION

Les strongles sont des parasites cosmopolites qui concernent les animaux au pâturage. Les ruminants se contaminent en ingérant des larves de strongles en même temps que l'herbe. Les strongyloses gastro-intestinales font partie des helminthoses majeures de pâturage, avec les strongyloses respiratoires, la fasciolose et la paramphistomose.

Ces infestations par les strongles gastro-intestinaux entraînent des pertes économiques parfois élevées, liées par exemple à une baisse de production de lait chez les chèvres laitières, un retard de croissance, et des pertes financières liées aux traitements préventifs et aux soins des animaux présentant des troubles cliniques. La mortalité est également une conséquence non négligeable à l'échelle du troupeau.

Sur les trente dernières années, les anthelminthiques ont représenté un arsenal thérapeutique performant et de plus en plus adapté aux exigences des vétérinaires et des éleveurs. Cette montée en puissance a contribué à l'atteinte d'un objectif de production meilleur. Cependant, l'utilisation massive de ces molécules a conduit à l'apparition alarmante de résistances presque partout dans le monde (Charlier, Bartley, Sotiraki, et al., 2022).

La résistance est la capacité des parasites à survivre à l'exposition à une molécule anthelminthique. Les nématodes du tube digestif sont les premiers à présenter des descriptions de leur résistance aux anthelminthiques, devant les trématodes comme *Fasciola hepatica* (Chauvin et al., 2015a). Depuis la première description de résistance aux benzimidazoles en 1964 chez des ovins (J. H. Drudge et al., 1964), la résistance aux antiparasitaires des strongles gastro-intestinaux (SGI) des petits ruminants est montée en puissance. Des élevages du monde entier font maintenant face à des parasites multi-résistants. Il n'est pas évident de démontrer l'impact économique de la résistance en raison de la nature insidieuse de celle-ci. Deux études portant sur la résistance aux antiparasitaires ont été faites en Nouvelle-Zélande en 2010 (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022) et 2012 (Chauvin et al., 2015a) dans des élevages ovins allaitants. Les animaux de ces élevages étaient fortement infestés par des espèces résistantes *Trichostrongylus colubriformis* et *Teladorsagia circumcincta*. Le résultat de cette étude est que l'infestation par les parasites entraîne une perte de 10 à 15% de la valeur de la carcasse de l'agneau. En outre, les deux espèces concernées ici ne sont pas très pathogènes comparées à *Haemonchus contortus*. L'impact économique du parasitisme serait alors plus important. Il s'agit du principal facteur limitant dans l'élevage de petits ruminants (Deplazes et al., 2016; H. Drudge et al., 1964). Devant l'apparition croissante de ces résistances aux molécules administrées aux petits

ruminants entre autres, il est préférable de repenser le système d'utilisation des anthelminthiques, et de les associer à d'autres techniques de lutte contre les strongles. Le but doit être de rechercher à la fois les performances de production et la réduction de la pression de sélection et de l'apparition de parasites résistants. Enfin, il importe d'évaluer l'efficacité des molécules dans les élevages afin d'éviter d'utiliser des molécules qui ne sont plus efficaces, et de détecter précocement le développement de résistance pour les autres molécules.

Nous ferons dans un premier temps une synthèse bibliographique sur les strongles et les méthodes de maîtrise de ces parasites, ainsi que les mécanismes de résistances aux anthelminthiques et les méthodes de détection des résistances. Dans la partie expérimentale, nous évaluerons le niveau de résistance de quelques élevages de la région lyonnaise à des antiparasitaires choisis à l'aide de tests *in vitro*.

1ERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

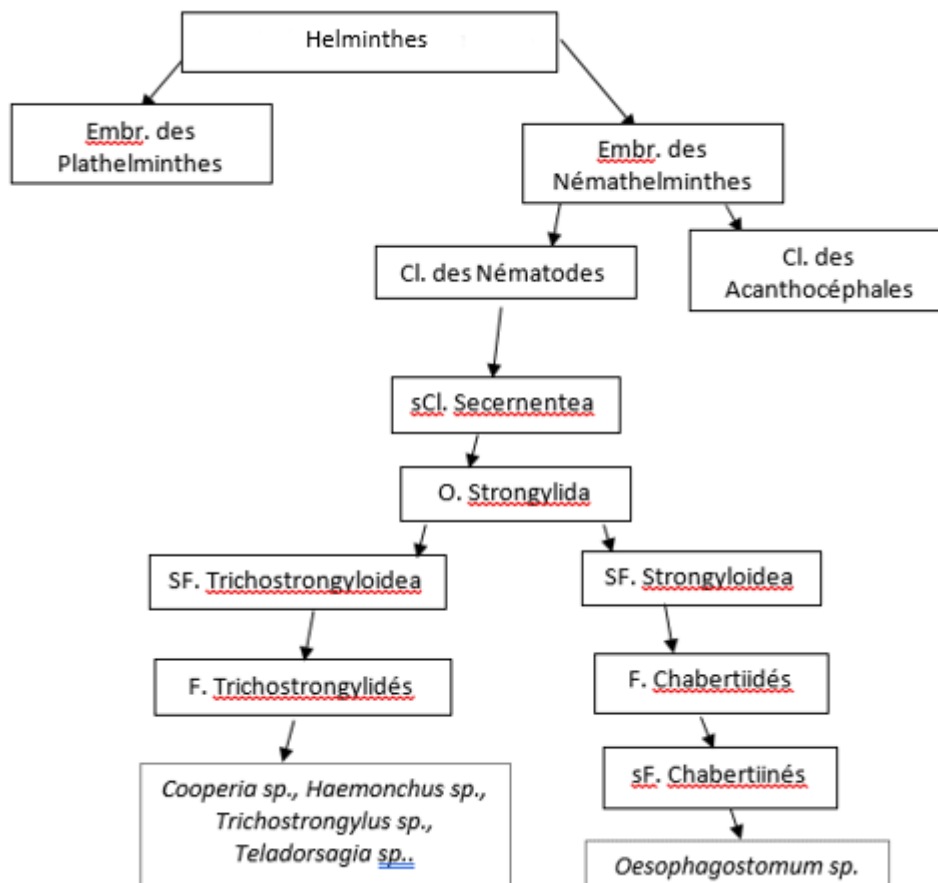
I. LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX DES PETITS RUMINANTS

A. Généralités

1) Classification

Les espèces de strongles dont nous parlerons ici se situent dans le règne des Helminthes.

Figure 1 : Classification des principaux genres de nématodes dans l'embranchement des nématodes



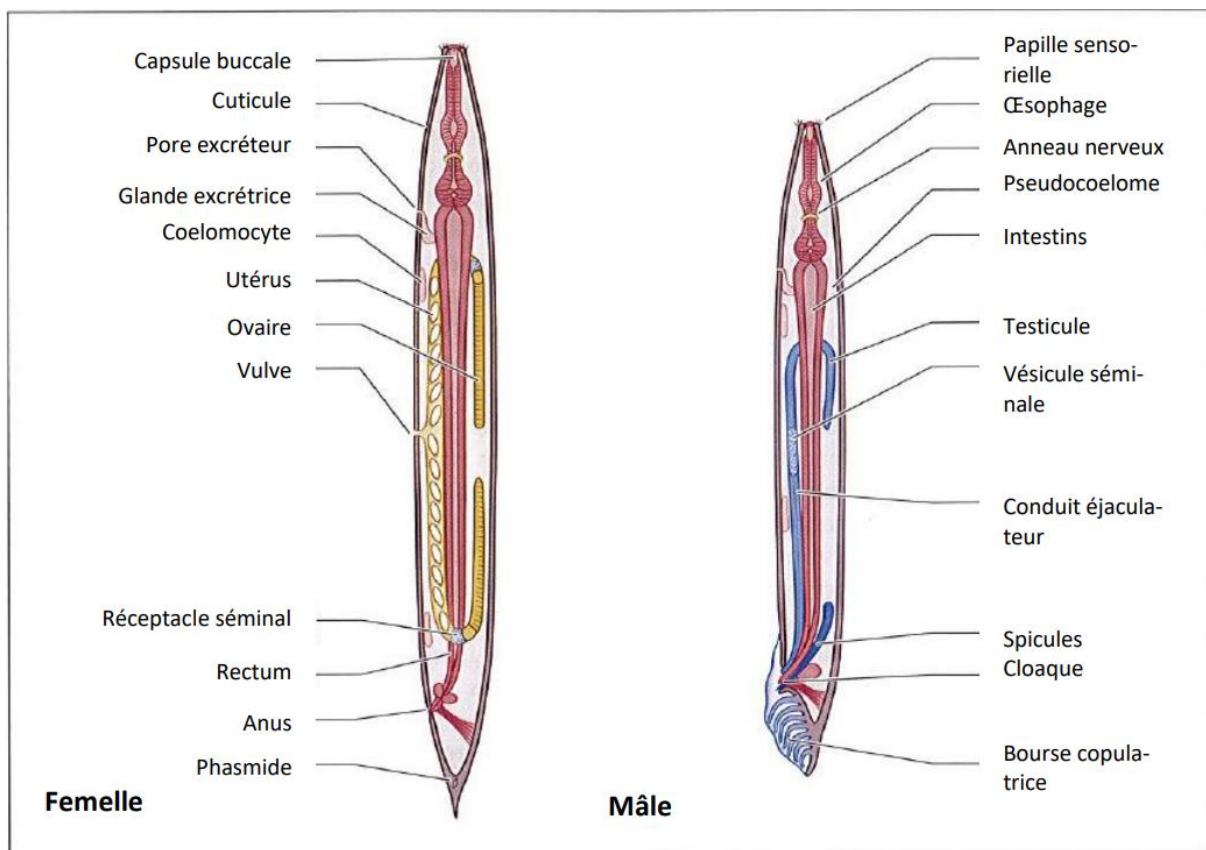
2) Morphologie

i. Morphologie générale

(Noble, 1964)

Les parasites que l'on appelle les strongles sont des nématodes de l'ordre des *Strongylida*. Ce sont des « vers » à corps allongé, cylindrique, non segmenté et pseudo-coelomates. Leur tube digestif est complet : ils possèdent une extrémité buccale et une extrémité anale. Ce sont des espèces dioïques, qui ont donc une reproduction sexuée avec accouplement. Les œufs sont de forme ovoïde ou ellipsoïde. Les coupes longitudinales de la Figure 2 exposent l'organisation interne des nématodes.

Figure 2 : Schéma général de coupes longitudinales de nématodes (Deplazes et al., 2016)



Les strongles peuvent mesurer de 4 à 100 mm. La différence entre les strongles des superfamilles étudiés ici se fait essentiellement en examinant la bourse copulatrice des mâles, et au niveau de la capsule buccale. Cette dernière est bien présente dans la superfamille des *Strongyloidea*, et réduite voire absente dans la superfamille des *Trichostrongyloidea*.

Ils sont fréquemment dotés d'une capsule buccale, bien développée et globuleuse, avec des dents, des crochets ou des couronnes de denticules, comme chez les parasites du genre *Bunostomum*. Elle se situe entre l'ouverture buccale et l'œsophage.

Les œufs sont ovoïdes, non operculés, délimités par une paroi lisse et foncée. Ils contiennent une larve ou une morula. Ils mesurent entre 60 et 80 µm et sont faciles à repérer au microscope. On ne peut cependant différencier les différentes espèces de strongles à la simple observation des œufs.

ii. Morphologie détaillée

(Noble, 1964)

Les parties proximale et caudale des nématodes peuvent présenter des expansions cuticulaires semblables à de petites ailes. Au niveau de la partie proximale, on appelle cette structure les *cervical ala* (ailes cervicales), et au niveau de la partie caudale, les *caudal ala* (ailes caudales).

Les muscles de la paroi du nématode sont bien développés. L'extérieur de son organisme est revêtu d'une cuticule non nucléée. Cette cuticule est souvent solide et a un rôle de protection. Elle est composée de neuf couches principalement composées de protéines. La cuticule subit un processus de kératinisation, ou une adjonction de polyphénols et de quinones, ou bien les deux. C'est ainsi que le parasite résiste à l'assaut des enzymes digestives de l'hôte qu'il infeste.

Le tube digestif est un simple tube commençant à la bouche à la partie antérieure du parasite, et se termine avec l'anus à la partie postérieure. On trouve juste après la bouche un œsophage musculueux, et le rectum juste avant l'anus, caractérisé par un petit élargissement du tube digestif distal.

Le système nerveux est constitué de deux anneaux de tissu nerveux : l'un autour de l'œsophage, l'autre autour de la partie distale des intestins. A cela s'ajoute des fibres nerveuses longitudinales qui joignent les deux anneaux, et qui s'étendent au-delà, aux extrémités antérieure et postérieure du parasite.

Le système excréteur varie beaucoup dans ce phylum. Nous ne décrivons que celui des parasites appartenant à la sous-classe *Secernentea*. Il s'agit de canaux longitudinaux qui s'ouvrent sur l'extérieur via un orifice situé à mi-longueur du parasite. Une glande s'abouche également à cet orifice. Les canaux longitudinaux sont souvent reliés par un canal transversal, qui donne à l'ensemble une forme de « H ».

Les nématodes n'ont pas de vaisseaux sanguins de manière générale, mais les organes baignent dans des fluides, qui contiennent de l'hémoglobine. On peut également trouver de l'hémoglobine dans les tissus de la paroi. On ne sait pas si l'hémoglobine a une affinité pour l'oxygène chez tous les nématodes. Les besoins en oxygène varient beaucoup chez ces individus, et même les parasites anaérobies ont besoin de petites quantités d'oxygène pour vivre. L'hémoglobine dans les fluides est peut-être un sous-produit de la digestion, ne jouant aucun rôle dans la respiration. Celle contenue dans la paroi servirait à fixer l'oxygène du milieu extérieur.

Voici ci-dessous les spécificités biologiques et morphologiques pour les espèces de SGI les plus courantes :

- *Haemonchus contortus* : parasite hématophage de la caillette des petits ruminants. Leur partie antérieure présente une ébauche de capsule buccale. Le mâle, de couleur rosée, possède une bourse copulatrice bien développée, formée de deux grands lobes latéraux et d'un petit lobe dorsal asymétrique. Il possède également deux spicules courts et trapus « en ciseaux » avec un gubernaculum. La femelle a des cordons génitaux rouges enroulés en spirale autour de son tube digestif.
- *Teladorsagia circumcincta* : parasite chymivore de la caillette des petits ruminants. C'est un petit vers marron doté d'une petite cavité buccale. Les mâles ont de fins spicules à trois fourches, et les femelles une vulve proche de l'extrémité caudale.
- *Trichostrongylus colubriformis* : parasite chymivore de la muqueuse digestive très petit et très fin. Il ne possède pas de renflement céphalique ni de capsule buccale. Le mâle possède des spicules courts et trapus, assez tordus.
- *Cooperia curticei* : parasite chymivore de l'intestin grêle des petits ruminants. Il n'a pas de capsule buccale. Il présente une extrémité antérieure dilatée, à cuticule striée transversalement. Les mâles ont des bourses copulatrices bien développées et des spicules courts, trapus et avec des expansions alaires moyennes, planes.
- *Oesophagostomum sp* : parasite chymivore de l'intestin grêle et du gros intestin des ruminants. Sa vésicule céphalique présente un rétrécissement en sablier à son tiers postérieur. On observe également une coronule interne.

3) Reproduction

(Noble, 1964)

Les nématodes sont des parasites dioïques, au dimorphisme sexuel marqué. Les phénotypes mâle et femelle diffèrent suivant la taille, la couleur et la forme de l'individu.

L'appareil génital femelle est constitué d'un ou deux tubules spiralés, qui s'unissent pour former un vagin s'ouvrant sur une vulve. Cette vulve est située sur la partie antérieure de l'individu pour le type prodelphé, postérieure pour le type opisthodelphé, au milieu du corps pour le type amphidelphé. La partie distale des tubules correspond aux ovaires, suivis des oviductes, puis de l'utérus qui se termine au vagin. Les femelles possédant un seul ovaire sont qualifiées de « *monodelphic* », tandis que celles possédant deux ovaires sont « *didelphic* ».

Le mécanisme de formation des œufs est complexe et encore mal compris. On sait que les œufs possèdent des enveloppes primaires produites par eux-mêmes et sont constituées de lipides. On a ensuite beaucoup de couches, d'épaisseur et de composition différentes selon les espèces.

L'appareil génital mâle est lui aussi constitué d'un tubule. L'extrémité distale est appelée le *testis*, qui est suivi du *vas deferrens*, qui rejoint ensuite l'extrémité des intestins au niveau du *cloaca*. Avant cette jonction, le *vas deferrens* s'élargit pour former un sac de stockage du sperme. La partie terminale de l'appareil génital mâle s'appelle le système d'éjaculation. Le transfert du sperme à l'appareil génital femelle est facilité par les spicules si le parasite en est doté. Ces longs appareils sont sclérosés, et peuvent être extériorisés hors du cloaque et servir d'organe de sensibilité tactile supplémentaire.

Le *gubernaculum* est un épaississement sclérosé de la cuticule, situé au-dessus du cloaque, et qui aide probablement à guider les spicules lorsqu'ils sont extériorisés.

Le *teleton* est un organe plus large, qui tapisse les parois ventrale et latérales du cloaque. C'est également un épaississement de la cuticule. Il guide les spicules lors de l'accouplement.

La partie postérieure des mâles dans certaines espèces de strongles est large et incurvée. Il s'agit de la bourse copulatrice. Elle permet au mâle de se maintenir à la femelle pendant l'accouplement. La morphologie des spicules et de la bourse copulatrice constituent des critères de diagnose majeurs chez les strongles digestifs, notamment les Trichostrongyloidea.

B. Cycle évolutif

(Noble, 1964)

Le cycle des strongles gastro-intestinaux des caprins est un cycle monoxène constitué de deux parties : une phase exogène, qui correspond au développement et à la survie du parasite dans l'environnement, et une phase endogène, lorsque le parasite se développe dans le tube digestif de l'animal.

La phase endogène commence à l'ingestion d'une larve de stade 3 (L3) infestante engainée, c'est-à-dire encore dans l'enveloppe de la larve 2 (L2), l'exuvie (Figure 2). Une fois ingérée, la L3 perd son exuvie puis mue en larve 4, généralement dans la muqueuse de l'organe cible. La deuxième mue, de larve 4 au stade immature, se fait dans la lumière de l'organe cible. La maturité sexuelle s'acquiert environ 17 à 20 jours après la contamination. Les parasites s'accouplent puis pondent ensuite des œufs dans la lumière du tube digestif. Certaines espèces, comme *Haemonchus contortus*, sont très prolifiques, une femelle pouvant pondre 5 000 œufs par jour. D'autres sont moyennement prolifiques, telles que *Cooperia* sp., ou très peu prolifiques, comme *Trichostrongylus* sp., et les femelles ne pondent que 100 œufs par jour. Les vers adultes ne survivent chez l'hôte que quelques mois pour *H. contortus*, à un an pour *Trichostrongylus* sp.

Si la période prépatente (i.e., délai entre la contamination de l'hôte par ingestion de L3 et le moment où les œufs excrétés par les parasites sont détectés dans les fèces pour le cas des strongles gastro-intestinaux) est le plus souvent de 3 semaines, celle-ci peut être fortement rallongée. En effet, il peut y avoir une inhibition du développement larvaire chez l'hôte à certains moments de l'année : c'est le phénomène d'hypobiose, qui dure plusieurs mois. Il s'agit de l'interruption du développement larvaire, généralement au stade larve 4. La localisation chez l'hôte dépend de l'espèce parasite : glandes et cryptes de la caillette pour *Teladorsagia* sp. et *Haemonchus* sp., cryptes de Lieberkühn ou lumière de l'intestin grêle pour *Cooperia* sp.. C'est un phénomène saisonnier qui a lieu en hiver dans nos régions, il est déclenché par les températures basses, alors qu'il a lieu durant la sécheresse dans les pays du Sud. Il est très fréquent chez *Teladorsagia* sp., fréquent pour *H. contortus* et moins chez les autres.

La phase exogène du cycle de ces parasites commence une fois les œufs émis dans les fèces. Ils évoluent pour donner une larve de stade 1 (L1) qui éclot dans les 12 à 24 heures s'ils sont dans de bonnes conditions. La L1 reste dans les matières fécales, où elle se nourrit et accumule des réserves. Elle mue en L2, qui survit de la même façon. Cette larve mue ensuite en larve 3, qui est engainée (i.e.,

elle reste dans l'enveloppe du précédent stade). Elle ne peut pas se nourrir et puise dans ses réserves. C'est le stade de survie du parasite qui migre hors de la bouse pour se retrouver dans le milieu extérieur et est capable de se déplacer sur le pâturage. Les L3 s'éloignent de quelques centimètres de la bouse pour être ingérées par les animaux, la zone jouxtant la bouse étant une zone de refus de pâturage. Cette migration nécessite un petit film d'eau, par suite d'un épisode de pluie ou grâce à la rosée, recouvrant l'herbe, et peu de lumière. Elle peut être horizontale, ou verticale lorsque les larves rentrent dans le sol ou montent de quelques centimètres sur les brins d'herbe. Noter qu'en l'absence d'animaux, les L3 peuvent survivre plusieurs mois sur la pâture si les conditions sont favorables (Chartier, 2009).

Cette phase exogène étant inhérente au cycle des strongles gastro-intestinaux des ruminants, on comprend donc qu'ils ne peuvent s'infester qu'au pâturage (Noble, 1964). L'étude de la dynamique parasitaire sur les sols des pâtures permet de comprendre les périodes à risque pour les animaux. A leur arrivée sur la pâture, les animaux s'infestent avec les larves trans-hivernantes ayant survécu au froid. Après un premier cycle, les premiers œufs sont excrétés et s'accumulent sur la pâture. Ils se transforment en larves, avalées par les animaux, et ainsi de suite (Cheah & Rajamanickam, 1997). Le pic de larves en pâture dépend des conditions météorologiques de la zone considérée. Le développement des œufs en L3 est dépendant d'un grand nombre de facteurs. Les larves de *Teladorsagia* sp. se développent au stade infestant à une plus faible température, 4°C minimum, que celles d'*Haemonchus* sp, 9°C minimum. Celles de *Trichostrongylus* sp. se situent entre les deux (O'Connor et al., 2006).

Le développement des œufs en L3 peut être très rapide dans d'excellentes conditions. Cheah et Rajamanickman ont étudié le sujet en Malaisie, où la température et le niveau d'humidité sont élevés. Ils ont établi que les L3 d'*H. contortus* et de *T. colubriformis* sont observées dès 4 jours après l'expulsion des œufs sur les bouses, et dès 5 jours à même l'herbe pour *T. colubriformis* et 6 jours pour *H. contortus*. En outre, des différences sont observées quant à la résistance à la dessiccation des fèces. *T. circumcincta* est une espèce chez laquelle le passage des œufs en L3 peut se faire avec un taux d'humidité très faible, contrairement à *H. contortus*, qui se développe plutôt dans des lieux aux étés chauds et humides (Cheah & Rajamanickam, 1997).

Des chercheurs mettant au point des modèles météorologiques se sont penchés sur le développement des L3 d'*H. contortus* suivant les précipitations et leur vitesse d'évaporation. Plus cette dernière est élevée, moins de larves atteignent le dernier stade. Une pâture plus riche en verdure est également plus propice à leur développement. La quantification des précipitations ne suffit pas pour

évaluer l'importance de l'humidité, car la pâture est un micro-écosystème dépendant d'une multitude de facteurs (O'Connor et al., 2006).

On comprend donc que la contamination d'une pâture par les strongles prend un caractère saisonnier.

La différence de sensibilité des individus est aussi un facteur important à considérer. Il semblerait que les chèvres en première lactation et celles produisant le plus de lait sont les plus réceptives aux SGI. Ce sont les individus qui excrètent le plus d'œufs (Hoste et al., 2002). En effet, les hautes productrices s'infestent davantage que les faibles productrices, et perdent plus en quantité de production, 25% pour les premières, 2 à 10% pour les autres. En outre, la mise-bas impliquant un relâchement de l'immunité, les femelles concernées excrètent également plus d'œufs que leurs congénères (Chartier, 2009).

Du côté des ovins, Hoste et al démontrent que les primipares excrètent plus d'œufs que les multipares, sans différence entre les faibles ou fortes productrices de lait (Hoste et al., 2006). En outre, les femelles en fin de gestation et en début d'allaitement sont aussi de plus importantes excrétrices (Jacquet et al., 2009).

C. Facteurs de survie

(O'Connor et al., 2006)

Chaque espèce de parasite a une niche écologique permettant le développement des L3. De nombreux facteurs interviennent sur la survie et le développement des larves :

- La luminosité

Elle ne doit pas être trop importante car les rayons ultra-violets détruisent les larves (Noble, 1964).

- L'humidité

Elles aiment l'humidité donc survivent facilement au printemps et à l'automne mais sont sensibles à la sécheresse et aux fortes chaleurs. (Noble, 1964). Leur survie est favorisée par la formation d'une croûte sur le pourtour de la bouse, gardant ainsi l'intérieur humide pendant plusieurs jours. Contrairement aux bovins, les fèces des petits ruminants n'assurent pas la survie des L3, qui se disséminent dans la pâture

- L'oxygénation

Le piétinement des fèces permet la formation de trous et favorise ainsi son aération, et donc l'apport d'oxygène aux stades libres (Noble, 1964).

- La température

La température idéale varie selon l'espèce. Donc selon les conditions environnementales, une espèce prédominera par rapport à une autre. *Haemonchus contortus* est moins résistant au froid que *Teladorsagia* sp. ou *Trichostrongylus* sp.. Globalement, la chaleur accélère le développement des larves, et favorise l'éclosion des œufs (Romero & Gruner, 1984).

En somme, l'humidité et le niveau d'oxygénation sont des éléments déterminants, tandis que la température est un régulateur. Si l'été est chaud et sec, le développement des larves n'est pas optimal. En revanche, les périodes humides et tempérées le favorisent. Les variations thermiques importantes ont un effet analogue à la chaleur, en plus progressif (Chartier, 2009).

D. Pathogénicité

(Soulsby, 1982)

1) Phénomènes physiopathologiques

(Noble, 1964)

Action mécanique et irritative : lors de leur migration dans le tube digestif, les larves sont amenées à créer des lésions de la muqueuse digestive, ce qui crée une inflammation locale avec un afflux de polynucléaires éosinophiles. Elles causent également une abrasion des villosités intestinales.

Action spoliatrice : les parasites hématophages se nourrissent de petites quantités de sang de leur hôte depuis le tube digestif ou les parenchymes. Ils peuvent produire des sécrétions hémolytiques ou des anti-coagulases pour faciliter leur nutrition. Un fort parasitisme à *Haemonchus contortus* peut conduire à une anémie. En outre, d'autres parasites spolient l'organisme en prélevant du chyme directement dans le tube digestif.

Inoculation de germes : les larves peuvent inoculer des germes comme des Clostridies en pénétrant dans la muqueuse digestive.

Perturbation du métabolisme : le parasitisme provoque des fuites protéiques intenses en raison de l'inflammation et des pertes tissulaires. Des lésions importantes de la caillette, par des parasites comme *Teladorsagia* sp., engendrent également une baisse de la prise alimentaire et de la digestibilité des nutriments, notamment les protéines. Le métabolisme protéique est dévié vers l'inflammation – engendrant une perte d'albumine – vers la cicatrisation et vers le turn-over de l'albumine : tout ceci se fait au détriment de la production. Des modifications des hormones gastro-intestinales sont observées : la trichostrongylose modifie la cholécystokinine, une enzyme gastro-intestinale induisant la satiété.

Il est donc important d'assurer la couverture des besoins pour combattre les effets négatifs sur la production de lait (Chartier, 2009).

Modification du pH : Les lésions de la caillette, liées notamment à *Teladorsagia* sp., modifient la sécrétion de l'acide chlorhydrique, et perturbe donc la régulation du pH dans la lumière de l'organe. La flore bactérienne de la caillette comme des intestins est aussi modifiée par suite de ces lésions.

Action toxique : le liquide de la cavité générale du parasite est toxique. Il est libéré après la mort de ce dernier. Dans le cas de certains parasites, il est dangereux de vermifuger un animal fortement parasité : la mort des strongles peut provoquer la libération de liquide toxique, l'animal peut faire un choc qui conduirait à sa mort.

Action antigénique et immunologique : le parasite sécrète une substance à l'origine d'une réaction immunitaire, permettant la mise en place d'immunité protectrice ou, plus gênant, d'hypersensibilité.

Perte d'appétit : elle est d'autant plus marquée que le parasitisme est massif. Une anorexie complète peut être observée. Le mécanisme physiologique est pour le moment mal connu. Il semblerait que cette manifestation clinique n'est pas causée par les lésions du tube digestif. Les études se tournent vers le taux d'hormones produites lors de la digestion, comme la gastrine, qui a pour effet de ralentir la motricité gastrique (Chartier & Hoste, 1996).

2) Signes cliniques

(Noble, 1964)

L'incubation sans hypobiose dure 4 à 5 semaines. Les signes cliniques sont pour la plupart non spécifiques et concernent tout le lot. On retrouve une diminution de la production, une baisse de la NEC, des troubles de la fécondité, une anémie, des entérites et des diarrhées surtout chez les jeunes.

La mortalité est possible en particulier parmi les jeunes et on peut observer des retards de croissance ou encore des toxi-infections à *Clostridium* sp. Les signes spécifiques dépendent du parasite.

- Haemonchose, due à *Haemonchus contortus* (Noble, 1964)

Elle est fréquente et grave. De manière générale, elle touche les chevreaux et chèvres allaitantes, et apparaît entre juin et septembre et peut être d'apparition brutale.

Il existe une forme aiguë chez les chevreaux, qui se caractérise par des morts subites par gastrite hémorragique liée à une infestation massive.

On trouve également une forme subaiguë à chronique chez les chèvres et les chevreaux plus âgés. Les individus présentent un syndrome anémique important et brutal, quand le niveau d'infestation devient élevé, pouvant s'accompagner d'une perte d'appétit, d'une faiblesse générale et d'œdèmes, notamment sous-glossien. On a occasionnellement une diarrhée ou une constipation. En fin d'évolution de la maladie, on observe une prostration, voire une mort de l'animal. Les vers peuvent être visibles à l'œil nu dans la caillette lors de l'autopsie (15 à 30 mm de long).

- Teladorsagiose, due à *Teladorsagia circumcincta* et cooperiose, due à *Cooperia* sp. (Noble, 1964)

La teladorsagiose est comparable à l'ostertagiose chez les bovins.

Il existe une forme aiguë (dite de type I) chez les chevreaux en pâturage, qui ont alors une diarrhée marquée avec un amaigrissement voire de la mortalité. On l'observe de juin à octobre et elle est due à la migration des larves dans la muqueuse de la caillette.

On a aussi une forme subaiguë (dite de type II) chez les chevreaux plus âgés au pâturage ou en bergerie, due à la levée d'hypobiose en fin d'hiver chez les jeunes nés l'année précédente. On observe un syndrome digestif avec une possible anémie et un mauvais état général, une perte de poids et une diarrhée intermittente pouvant conduire à la mort.

- Trichostrongylose, due à *Trichostrongylus colubriformis*

On observe des signes d'inconfort gastro-intestinal, comme une baisse d'appétit. Lors d'une infestation suraiguë, les animaux sont faibles et dans l'incapacité de se lever. Ils meurent rapidement.

Lors d'infection chronique, l'appétit est variable, les animaux s'amaigrissent, se déshydratent. Des épisodes de constipation et de diarrhée alternent. Si une anémie est présente, elle reste discrète.

- Oesophagostomose, due à *Oesophagostomum* sp.

Cette affection se manifeste chez les agneaux en premier lieu par une diarrhée persistante et marquée. Il en découle un épuisement et la mort si les animaux ne sont pas vite traités et changés de pâture par la suite. La diarrhée est de couleur vert foncé, muqueuse et parfois hémorragique. Les animaux ont le dos voussé, les postérieurs raides, et souvent la queue relevée.

Lors d'infection chronique, les premiers symptômes peuvent se manifester par une diarrhée, suivie de constipation, ponctuée d'épisodes de diarrhées. Cela conduit l'animal à s'amaigrir, se déshydrater et à s'affaiblir. Le tableau clinique de cette infection chronique est la chèvre cachectique et amyotrophiée, se terminant par une prostration marquée un à trois jours avant la mort.

Les signes cliniques déclenchés par cette infestation sont plus ou moins modulés par l'immunité qui se met en place.

3) Immunité

La présence de parasites chez tout type de mammifères génère inévitablement une réponse immunitaire, due au départ au grand nombre d'antigènes portés par chaque parasite, regroupés sous le nom de PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*. Nous nous concentrerons ici sur l'immunité vis-à-vis des strongles. L'immunité innée est cependant peu efficace : la réaction inflammatoire peut être faible et la phagocytose est impossible du fait de la taille des parasites. Leur cuticule externe leur permet de résister aux lymphocytes T cytotoxiques et à l'action du complément : la réponse cellulaire Th1 est donc peu efficace (elle existe cependant, lors d'une infestation chronique, et peut limiter la diffusion du parasite sans l'éliminer). Les PAMPs sont reconnus par les cellules sentinelles, comme les cellules dendritiques qui ont un rôle pivot : elles capturent et présentent les antigènes parasitaires et orientent la réponse immunitaire vers une réponse humorale Th2 (Craig et al., 2007).

Les plasmocytes produisent des IgE qui reconnaissent les antigènes parasitaires. Ils sécrètent également de l'interleukine 4 (IL4), IL5, IL10 et IL13, qui accroissent l'activité des mastocytes et éosinophiles (Lacroux et al., 2006). En se liant aux IgE et aux antigènes parasitaires, les mastocytes dégranulent. Ils libèrent des molécules vasoactives, des prostaglandines et des leucotriènes, qui recrutent les polynucléaires éosinophiles, et provoquent leur dégranulation. Les molécules contenues dans ces granules (des enzymes, de l'eau oxygénée...) détruisent la cuticule des parasites. Les molécules vasoactives provoquent aussi la contraction des muscles lisses aboutissant à l'expulsion des parasites (Inman & Hudson, 2011). Lacroux et al. montrent que vis-à-vis d'*Haemonchus contortus*,

l'infestation génère une réponse anticorps IgG et IgA, activant le système immunitaire, dans la muqueuse abomasale et entraînant ainsi une infiltration cellulaire par les cellules citées au début du paragraphe (Lacroux et al., 2006).

Après un certain temps de contact avec le parasite, l'hôte devient résistant via un phénomène de « prémunition » (terme anglo-saxon), un état de résistance à une infection établit à la suite d'une infection aigüe devenue chronique, et qui dure aussi longtemps que le parasite reste dans l'organisme de l'hôte. En premier lieu, l'immunité innée intervient, grâce aux cellules épithéliales qui jouent un rôle de barrière. Ensuite, l'immunité adaptative s'oriente dans la voie Th2. Les polynucléaires éosinophiles et les mastocytes sont recrutés dans les muqueuses parasitées, avec des anticorps tels que les IgG et les IgA.

Une fois cet état de prémunition atteint, il y a trois possibilités : soit elles entrent en hypobiose, soit les larves sont éliminées, soit elles évoluent en adultes (Dwight & Bowman, 2014)

Chez les chèvres, les infections répétées ne produisent qu'une réponse immunitaire modérée. Des chercheurs évoquent des modifications histologiques sévères de la muqueuse et un taux de recrutement des lymphocytes T plus élevé que chez les autres espèces. Cet emballement empêcherait le bon fonctionnement du système immunitaire (Chauvin et al., 2015c). Ainsi, le niveau d'infestation des adultes se trouve égal ou même supérieur à celui des plus jeunes. Chez la chèvre, la maîtrise des infestations parasitaires est une problématique constante au cours de la vie de l'animal (Chartier, 2009).

Des éléments de diagnostic sont indispensables afin de détecter au plus vite ces infestations.

E. Diagnostic

1) Examen clinique

Plusieurs éléments cliniques peuvent conduire à la suspicion d'une infestation par des strongles. On peut relever un mauvais état général et une Note d'Etat Corporel (NEC) faibles, une inappétence et des troubles digestifs comme de la diarrhée. On peut aussi penser à des parasitoses digestives sur les animaux anémiés, ou ayant un Gain Moyen Quotidien ou une production laitière plus faible (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022). Ces éléments sont à nuancer avec le contexte épidémiologique. Elles sont de plus sont non spécifiques, et doivent être différenciées des autres affections digestives.

L'indice FAMACHA est une notation basée sur la coloration de la muqueuse oculaire, et est peu utilisé en France métropolitaine en raison de la faible infestation par les espèces hématophages. En effet, il témoigne chez nous essentiellement de l'infestation par *Haemonchus contortus* (Le Mer, 2017). En plus, cela représenterait une charge de travail considérable pour les éleveurs. Ce test a une mauvaise sensibilité car il nécessite une baisse de l'hématocrite en-dessous de 20% pour être sensible (Chauvin et al., 2015c).

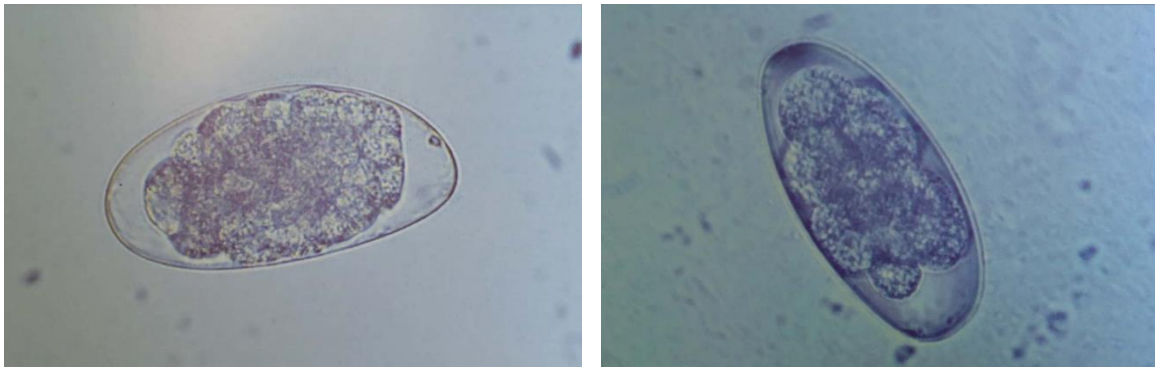
Pour ce qui est de l'haemonchose, l'évolution épidémiologique peut être plus brutale que les autres infestations parasitaires en période estivale orageuse. Cela est dû à la succession de périodes sèches et d'autres orageuses, donc humides, qui libèrent rapidement une grande quantité de L3 des fèces sur la pâture, favorisant une infestation brutale.

2) Examens complémentaires

- Analyse coprologique

L'analyse coprologique consiste à identifier et à quantifier les œufs de strongles gastro-intestinaux. Tous les œufs de SGI ont le même aspect, et sont donc indifférenciables les uns des autres. Ils sont de forme ovale, contiennent une morula visible, et mesurent entre 60 et 80 μm (Zajac & Conboy, 2012).

Figure 3 : Œufs de *Trichostrongylus* sp. (à gauche) et d'*Haemonchus* sp. (à droite) observés au microscope optique



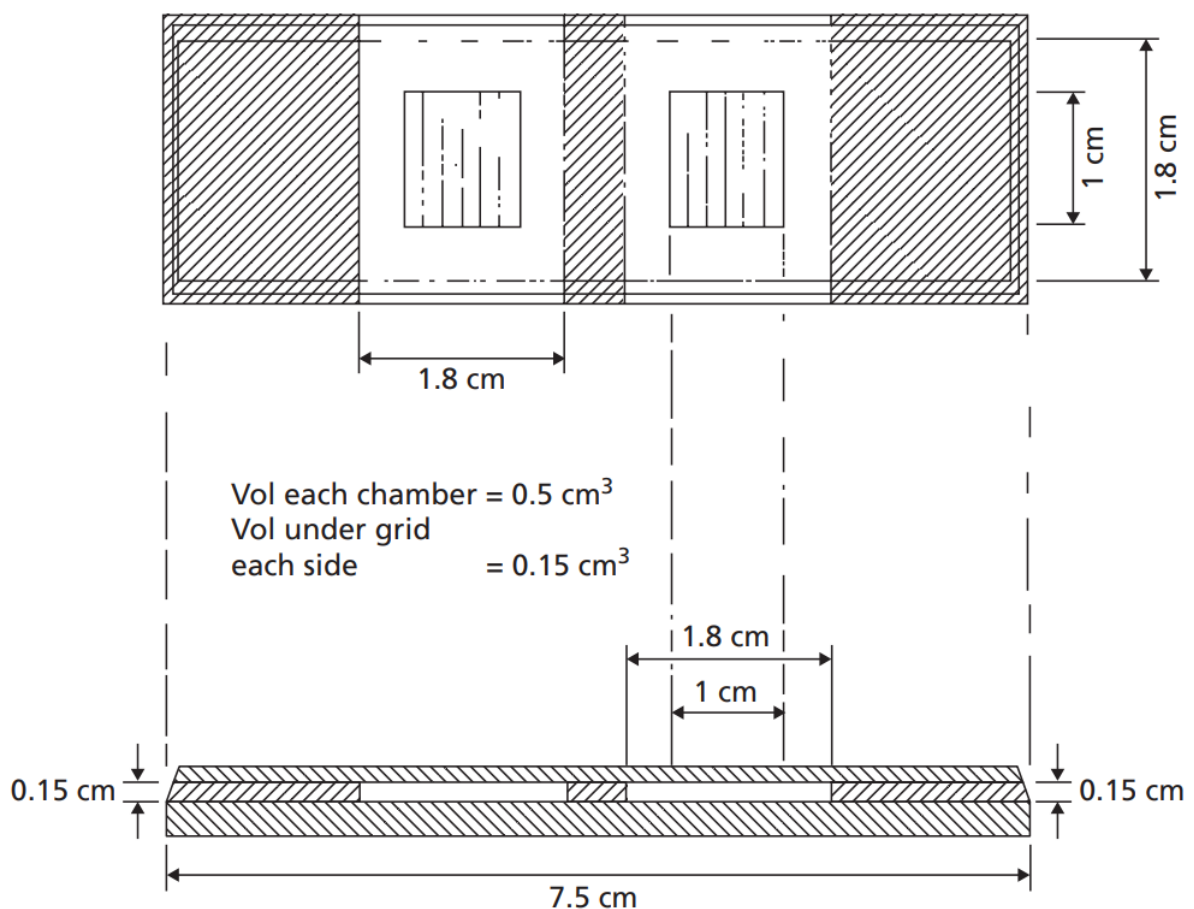
La coproscopie qualitative est inutile et il est important d'effectuer une quantification car du moment que les animaux vont au pâturage, ils seront parasités par des SGI, dont on retrouvera les œufs dans les fèces. L'identification par coproscopie présente des limites en raison de l'excrétion variable des œufs par les femelles parasites, mais elle reste la technique la plus simple et la plus fiable à mettre en œuvre (Chartier, 2009).

On réalise souvent des analyses sur un lot et non seulement sur un seul animal, surtout chez les caprins. La coproscopie de mélange est un outil de pilotage du parasitisme gastro-intestinal chez les petits ruminants. Elle constitue un bon indicateur de l'intensité du parasitisme dans un lot, et permet de rationaliser les traitements à moindre coût.

Nous allons voir le principe de réalisation d'une analyse coproscopique quantitative utilisant une lame de MacMaster. Cette méthode est couramment employée et son principe est le suivant :

Les matières fécales de 15 animaux d'un lot sont collectées. Elles sont mélangées au laboratoire, puis une quantité connue est prélevée, et diluée dans un volume connu d'un liquide de densité supérieure à 1. Une solution couramment utilisée pour la quantification des œufs de strongles est l'eau saturée en NaCl (Ijaz et al., 2009). L'ensemble est filtré, puis, après homogénéisation, quelques gouttes de filtrat sont prélevées et déposées dans une cellule de Mac Master (Figure 4) (Avramenko, Redman, Lewis, et al., 2017).

Figure 4 : Schéma d'une cellule de Mac Master



Elle comprend deux chambres de flottation. Le volume de ces chambres (1 mL au total ; 0,30 ml pour les 2 zones quadrillées) étant précisément connu, on peut calculer la quantité d'œufs présents par gramme de fèces, avec la formule suivante :

$$N = \frac{n1 + n2}{2} * 100$$

Avec n1 le nombre d'œufs dans la zone quadrillée de la première chambre de lecture, et n2 le nombre d'œufs dans la seconde (Noble, 1964), pour une dilution au 15^e.

Classiquement, on utilise la grille d'interprétation suivante pour les petits ruminants, à corrélérer avec la clinique :

Tableau 1: Grille d'interprétation du nombre d'œufs obtenus en coproscopie

Niveau d'infestation	Nombre d'opg
Faible	< 500 opg
Moyen	500 à 1000 opg
Fort	> 1000 opg

Ces valeurs restent indicatives et à adapter à l'élevage, aux conditions épidémiologiques, comme la présence d'*Haemonchus contortus*, où les résultats obtenus doivent être majorés (Chartier, 2009).

- Autopsie

On peut observer soit les parasites directement, soit les lésions qu'ils ont causées. Dans la caillette, on peut trouver de grands vers rouges (15-25 mm) sur la muqueuse, qui correspondent à *H. contortus*. La présence d'une gastrite nodulaire évoque une teladorsagiose. Pour ce qui est de l'intestin grêle et du gros intestin, la présence de nodules signe une oesophagostomose. Les laboratoires spécialisés font des dénombrements et de l'identification des parasites visibles (Chartier, 2009).

- Analyse sanguine

Comme chez les bovins, il est possible de doser le pepsinogène dans le but d'évaluer la présence ou non de strongylose abomasale (Chartier, 2009).

Les glandes gastriques produisent du pepsinogène et de l'acide chlorhydrique HCl. Le pH acide de la caillette permet la transformation du pepsinogène en pepsine. Les larves

d'*Ostertagia*/*Teladorsagia* , sont localisées dans les culs de sac glandulaires de la caillette, et détruisent les cellules productrices d'HCl entraînant une augmentation du pH. La transformation du pepsinogène en pepsine ne peut alors plus se faire, le pepsinogène s'accumule. Plus il y a de larves dans ces culs de sac, plus le taux de pepsinogène dans le sang est élevé. C'est un marqueur peu utilisé sur le terrain.

3) Identification des espèces de strongles gastro-intestinaux

- Coproculture

Le large spectre d'action de la plupart des anthelminthiques sur les SGI n'encourage pas au travail de l'identification des différentes espèces. Le diagnostic de l'espèce pourrait cependant guider le vétérinaire vers un traitement plus adapté que ce qu'il aurait proposé d'emblée. Ce diagnostic n'est pas possible à partir de l'observation des œufs, qui sont très proches morphologiquement entre espèce. Les genres, voire les espèces, sont identifiables morphologiquement à partir du stade L3.

La coproculture n'est pas utilisée en routine dans la pratique vétérinaire. Une méthode possible consiste à cultiver des œufs dans des boîtes de Petri, contenant de l'agar-agar et un peu d'eau. Ces boîtes sont mises dans une enceinte fermée à environ 22°C pendant 24h. Une solution nutritive est ensuite ajoutée. Les larves sont comptées au bout de 13 jours (Hubert & Kerboeuf, 1984). Le plus simple reste de cultiver les fèces directement et d'en isoler les L3.

- Méthodes moléculaires

De nouveaux outils moléculaires sont développés pour être plus précis dans l'identification des espèces de strongles. Ces méthodes sont plus sensibles et spécifiques et nécessitent moins d'intervention de la part d'un manipulateur. Il est possible aujourd'hui d'utiliser la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), la ddPCR (*Digital Droplet PCR*), ou le nématobiome, une amplification et séquençage des gènes de l'ensemble des nématodes présents dans un prélèvement donné (Avramenko, Redman, & Lewis, 2017).

4) Collection de données

L'identification électronique des animaux permet aux agriculteurs de collecter et d'analyser un grand nombre de données individuelles, notamment dans le développement de la stratégie des traitements sélectifs, traitements ne ciblant que des animaux sélectionnés au préalable selon certains critères développés dans la partie III.A.2.. Cette stratégie est basée sur la prédiction de gain de poids. L'éleveur repère les animaux les plus maigres, donc les animaux potentiellement les plus affectés par

l'infestation par les SGI et qui bénéficieraient le plus d'un traitement anthelmintique (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

D'autres données telles que le temps de pâturage, l'évaluation de la NEC, les dates des traitements administrés ainsi que leur nature servent aussi à prendre des décisions, car elles font partie des commémoratifs de l'animal (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

Les strongles gastro-intestinaux sont donc une problématique majeure dans l'élevage des caprins. La principale méthode de lutte consiste en l'administration d'anthelmintiques.

II. LES ANTHELMINTHIQUES : CONTROLE DU PARASITISME MAIS ORIGINE DE LA PROBLEMATIQUE DES RESISTANCES

La gestion du parasitisme en élevage n'est pas chose aisée car il faut trouver un compromis entre le niveau d'infestation et la productivité des animaux. Ils ne doivent pas être trop infestés pour que leur organisme et donc la production n'en subissent pas les conséquences, mais il n'est pas possible de les traiter trop souvent non plus.

A. Les anthelmintiques

1) Les benzimidazoles et pro-benzimidazoles

(Syndicat de l'industrie du médicament et diagnostic vétérinaires, s. d.)

Cette famille d'antiparasitaires comprend l'albendazole, le fenbendazole, l'oxfendazole et le nétobimine.

Ils agissent par inhibition de la polymérisation de la β -tubuline en microtubules par fixation irréversible sur la tubuline dans les cellules des individus, adultes et larves comme les œufs. Il en résulte une réduction de la libération de médiateurs au niveau neuromusculaire et de l'absorption du glucose par le parasite, et donc son élimination passive dans les selles. L'autre mécanisme d'action est la diminution du métabolisme énergétique par une inhibition de la fumarate-réductase mitochondriale, spécifique aux helminthes.

Ils sont actifs à tous les stades de vie des parasites, et sont donc à la fois ovicides, larvicides et adulticides. Cependant, leur efficacité sur les larves en hypobiose est partielle. Ils sont rapidement éliminés car ils n'ont pas de rémanence.

Les benzimidazoles et pro-benzimidazoles possèdent une embryotoxicité si la dose est supérieure à 10 mg/kg pendant le premier tiers de gestation.

Chez la chèvre, il faut doubler la posologie par rapport aux bovins. Les posologies sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Posologie des benzimidazoles chez les caprins

Molécule	Nom déposé	Posologie	Voie d'administration
Oxfendazole	Oxfenil 2,265% Synanthic	10 mg/kg PV	PO
Fenbendazole	Panacur 2,5% Panacur 4%	10 mg/kg PV	PO
Albendazole	Valbazen 1,9%	7,5 mg/kg PV	PO

1) Endectocides

(Sutherland & Leathwick, 2011)

Aussi appelées lactones macrocycliques, cette catégorie regroupe les avermectines et les milbémycines. Elles activent les canaux chlorures glutamate-dépendants (GluCl) en augmentant la perméabilité aux ions chlorures des récepteurs au glutamate et génèrent une paralysie flasque essentiellement chez les adultes. Elles agissent également sur les récepteurs GABA en augmentant également la perméabilité aux ions chlorures, ce qui est responsable des effets toxiques.

Ces molécules sont actives sur les adultes et les stades larvaires, même en hypobiose. Ce sont des molécules lipophiles, il faut donc faire attention à leur emploi chez les individus fragiles ou en mauvaise condition corporelle. Leur rémanence est de 2 à 17 semaines selon la molécule (dépendant de la lipophilie), la galénique, l'état d'engraissement et le parasite.

Leur utilisation est interdite sur les femelles laitières en lactation, sauf pour l'éprinomectine (Eprecis®, Eprinex®).

Tableau 3 : Posologie de l'éprinomectine chez les caprins

Molécule	Nom déposé	Posologie	Voie d'administration
Eprinomectine	Eprecis 20 mg/mL	0,2 mg/kg PV	SC
Eprinomectine	Eprecis 5 mg/mL Eprinex multi 5 mg/mL	1,0 mg/kg PV	Pour-on

2) Imidazothiazoles (et tétrahydropyrimidines)

Le seul représentant de la famille des imidazothiazoles est le lévamisole. C'est un agoniste cholinergique nicotinique qui provoque une paralysie musculaire tétanisante à l'origine de la mort du vers. Cette action est complétée par une stimulation du péristaltisme grâce aux effets cholinomimétiques du lévamisole sur le tractus digestif de l'hôte, qui facilite l'élimination par les fèces.

Les tétrahydropyrimidines représentées par le pyrantel et l'oxantel ont le même mode d'action.

Les molécules de ces deux familles sont actives sur les adultes uniquement en ce qui concerne les SGI. Elles n'ont pas non plus de rémanence donc sont éliminées rapidement. L'index thérapeutique de ces molécules est étroit mais les produits sont peu coûteux.

3) Salicylanilidés

Les molécules stronglycides de cette famille sont le closantel et le nitroxylin. Ce sont des découpleurs de la phosphorylation oxydative mitochondriale aérobie qui perturbent ainsi le métabolisme énergétique du parasite. La cible n'est donc pas spécifique aux parasites d'où une faible utilisation en pratique. On a une action sur les strongles hématophages. Ils sont adulticides, larvicides mais pas ovicides. On peut associer un benzimidazole pour toucher un plus large spectre.

La fixation de la molécule sur l'albumine plasmatique est à l'origine d'une rémanence de 4 à 6 semaines selon l'espèce de parasite considérée.

Leur utilisation est interdite chez les femelles laitières en lactation.

4) Les dérivés d'aminocétonitrile (AAD)

Cette famille est représentée par le monépanel. Sa cible est le récepteur nicotinique à l'acétylcholine de la sous-famille DEG-3. Cette famille de récepteurs est spécifique des nématodes et explique l'absence de toxicité chez l'hôte. La molécule provoque une hypercontraction des muscles

corporels, qui conduit à des contractions spasmodiques de la portion antérieure du pharynx, puis à la paralysie et à la mort du parasite.

Le monépanel est efficace sur les adultes et les L4 des principales espèces de SGI chez le mouton et la chèvre (EMA, 2014). Il a prouvé son efficacité sur les souches de nématodes multi-résistantes aux autres médicaments anthelminthiques. Il ne présente pas ou peu de rémanence.

Il présente une grande sécurité d'emploi car il peut être utilisé sur les agneaux de plus de 10 kg et les femelles en gestation. Il n'est pas autorisé chez les femelles laitières.

L'utilisation de ces différentes molécules doit idéalement laisser place à un contact hôte parasite avant leur administration.

Nous allons maintenant définir la résistance et montrer son étendue dans l'élevage.

B. Etat des lieux de la résistance

1) Définition de la résistance

La résistance correspond, pour une population précise, à l'existence d'une plus grande proportion de parasites capables de survivre à une exposition donnée à un anthelminthique, par rapport à une population normale de référence (Chauvin et al., 2015a).

On considère un parasite résistant dès lors que la réduction du nombre de parasites post-traitement est inférieure à 95% (Sutherland & Leathwick, 2011).

2) Etat des lieux de la résistance dans le monde et en Europe

Les pays dans le monde les plus concernés par les résistances aux anthelminthiques sont la Nouvelle-Zélande, l'Argentine et le Brésil. En Nouvelle-Zélande, ce sont 90% des élevages qui sont concernés par la résistance. Chez les bovins, les lactones macrocycliques sont souvent remises en cause, et le genre le plus résistant est *Cooperia*.

En Europe, la première étude à montrer l'existence d'une résistance à des antiparasitaires date de 1999 et montre une inefficacité de l'ivermectine sur des bovins infestés sur *Cooperia* (Stafford & Coles, 1999). La review de Rose Vineer de 2020 fait une synthèse sur la résistance aux anthelminthiques en Europe, sur la base de 197 publications portant sur 535 études dans 22 pays européens des années 80 à 2020. De manière générale, la résistance aux anthelminthiques est plus marquée chez les petits ruminants face aux benzimidazoles, alors que chez les bovins, c'est la famille des lactones

macrocycliques qui est la plus concernée. Ils indiquent que le niveau moyen de résistance des nématodes gastro-intestinaux aux benzimidazoles est de 48 et 51%, aux lactones macrocycliques (exceptée la moxidectine) de 29 et 44%, au lévamisole de 32 et 20%, respectivement pour les ovins et les caprins (Paraud, et al., 2014).

La résistance des SGI des ruminants aux anthelmintiques a été rapportée dans tous les pays dans lesquels des études ont été menées. La tendance est une augmentation des prévalences, et notamment en ce qui concerne les benzimidazoles. Au Royaume-Uni, par exemple, la prévalence s'élève à 50% sur la période étudiée, et passe à 89% à partir de 2010, pour ce qui est du thiabendazole. Depuis les années 80, la durée entre la mise sur le marché d'une nouvelle molécule anthelmintique, et l'apparition d'une résistance à son encontre raccourcit dans le temps.

Toutefois, la faible prévalence de résistance aux anthelmintiques en Italie, malgré les études effectuées, montre qu'il est possible d'enrayer ce phénomène avec une utilisation raisonnée des traitements. C'est le seul pays avec une telle tendance.

3) Etat des lieux de la résistance en France

i. Bovins

Nous avons une étude réalisée en 2013 sur huit troupeaux laitiers qui montre que le FECRT est inférieur à 95% pour l'ivermectine et la moxidectine, pour la totalité d'entre eux. La coproculture faite en post-traitement met en évidence principalement *Cooperia* dans les bouses. C'est apparemment l'espèce la moins sensible chez les bovins aux antiparasitaires. Ce parasite a une prolificité plus importante que les autres, et la distribution des lactones macrocyclique dans l'intestin grêle, où se trouvent les adultes, est moins grande que dans la caillette. Ces éléments facilitent malheureusement l'apparition des résistances (Dravigney et al., 2022).

Geurden et al. ont étudié en 2015 la résistance de strongles de bovins à l'ivermectine et à la moxidectine, pour une dose de 0.2 mg/kg de poids vif. L'étude a concerné 753 individus répartis en Allemagne, au Royaume-Uni, en Italie et en France. Les individus étaient intégrés dans l'étude après vérification de la présence de parasites avec un comptage des œufs, et affecté à l'un des deux groupes de traitement. Chaque lot était constitué de 7 à 10 animaux. Un comptage des œufs était de nouveau réalisé 14 jours après le traitement, et le pourcentage de réduction était calculé selon la première valeur, déterminée avant traitement. Le statut est déclaré résistant si le FECRT est inférieur à 95%.

Sur les 40 fermes de l'étude, la résistance à la moxidectine est avérée dans 5 fermes, de même pour l'ivermectine. Néanmoins, on observe tout de même une diminution de l'efficacité des anthelminthiques dans la moitié des fermes (Geurden et al., 2015).

Dravigney et al. ont étudié en 2022 la résistance aux anthelminthiques dans des troupeaux de bovins du Haut Cantal, où la pression dans des élevages semi-extensifs n'est pourtant pas censée être si importante. Les individus rentrés dans l'étude étaient des broutards et des génisses de renouvellement, dans des troupeaux laitiers et allaitants. Onze troupeaux sont rentrés dans l'étude. Les animaux ne recevaient qu'un ou deux traitements par an, en cours de pâturage, et avec la même molécule. Trois traitements ont été utilisés selon les habitudes des éleveurs : l'ivermectine par voie sous-cutanée à 200 µg/kg, l'oxfendazole buvable à 4,5 mg/kg, ou un bolus d'oxfendazole libérant 1250 mg de cette molécule toutes les 3 semaines, 6 fois. Les auteurs ont ensuite réalisé un FECRT. L'efficacité des traitements était évaluée par rapport aux coproscopies pré-traitement, en raison de la difficulté à mettre en place un groupe témoin. Les élevages étaient qualifiés de résistants lorsque le FECRT était inférieur à 95% et la borne inférieure de l'intervalle de confiance inférieure à 90%. Ils étaient sensibles lorsque ces critères étaient supérieurs à leurs valeurs respectives. Les auteurs constatent une résistance des strongles à l'ivermectine dans 6 troupeaux, et à l'oxfendazole dans 2 troupeaux sur les 11. Il s'agit de la première étude en France qui montre une telle résistance à l'ivermectine des strongles des bovins (Dravigney et al., 2022).

ii. Caprins

L'évaluation de la résistance des SGI des caprins aux anthelminthiques en France est un sujet peu abordé. Depuis les années 80, on observe une très forte prévalence de la résistance des SGI aux benzimidazoles chez les chèvres, notamment en raison de la fréquence très élevée des traitements, du recours presque exclusif à cette famille de molécules du fait de son délai d'attente nul pour le lait, et du sous-dosage systématique dû à l'application des doses recommandées chez les ovins (Chartier, 2009).

Une première étude, datant de 2001, a été réalisée dans le Sud-Ouest de la France. Elle étudiait la résistance aux benzimidazoles et au lévamisole chez les caprins. Les individus provenaient d'élevages extensifs (18 en tout), avec dans chacun 45 chèvres réparties en 3 groupes de 15 individus (un groupe traité au fenbendazole (dose 10 mg/kg PO), un autre au lévamisole (dose 12 mg/kg PO), et un dernier témoin). Par la suite, des FECRT individuels ainsi qu'une coproculture de mélange ont été réalisés. Les FECRT ont montré l'existence d'un phénomène de résistance dans 15 élevages sur 18 pour les

benzimidazoles, et dans 2/18 fermes au lévamisole. Des tests *in vitro* ont été conduits sur des œufs extraits des fèces du groupe de chèvres traitées au benzimidazole. La DL50 obtenue était de 0.1 mg de thiabendazole/mL. La valeur seuil utilisée par Mickiewicz en 2020 est de 0.1 µg/mL (Mickiewicz, Czopowicz, Kawecka-Grochocka, Moroz, et al., 2020), nous sommes bien au-delà. Les parasites étaient résistants dans tous les cas (Chartier et al., 2001).

En somme, l'usage répété et presque exclusif des benzimidazoles dotés d'une AMM pour les chèvres laitières (fenbendazole, oxfendazole, fébantel) a conduit au développement de ces résistances de populations de strongles. On considère aujourd'hui que la quasi-totalité des élevages caprins en France sont touchés par la résistance aux benzimidazoles (Paraud et al., 2013).

Une seconde étude, ne portant que sur un seul élevage en Indre-et-Loire, a étudié la résistance des SGI des caprins au lévamisole et au fenbendazole. Trente chèvres ont été séparées en un groupe témoin non traité (15 individus) et un groupe traité au lévamisole à la dose de 12 mg/kg PO (15 individus). Dix jours plus tard, des coproscopies quantitatives individuelles et une coproculture de mélange sont réalisées. Dans le même temps, des chèvres ont été infestées oralement par des L3 issues d'une coproculture réalisée sur l'ensemble des animaux de l'élevage. Les individus ont été répartis dans 4 groupes d'étude : témoin, fenbendazole PO, lévamisole PO, fenbendazole + lévamisole PO. Au terme de cinq jours, les chèvres sont euthanasiées et les vers présents dans le tube digestif sont dénombrés. Les auteurs ont montré par cette étude que *Trichostrongylus* sp. était résistant à toutes les molécules. En effet, la réduction d'excrétion fécale était de 0 % pour le fenbendazole, 38 % pour le lévamisole, et 34 % pour l'association des deux molécules. Cette dernière était plutôt efficace sur la réduction d'excrétion fécale d'œufs de *Teladorsagia* sp. (à hauteur de 70 %) même si une population sensible est définie par une réduction d'excrétion fécale de 95 %. Les larves identifiées à la coproculture sont à 98 % des larves de *Trichostrongylus* sp. ou *Teladorsagia* sp., les 2 % restants sont des larves d'*Oesophagostomum* sp. ou *Chabertia* sp. (Silvestre et al., 2007).

Geurden et al. en 2014 (Geurden et al., 2014) ont étudié la résistance de parasites de brebis aux benzimidazoles, au lévamisole, ainsi qu'à des lactones macrocycliques dans 10 élevages du sud-ouest de la France et dans l'Aveyron. Il en est ressorti que tous les élevages étaient résistants aux benzimidazoles. L'étude soulève cependant la grande efficacité du traitement par des lactones macrocycliques par voie orale des animaux.

A la même époque, dans la Loire et dans l'Allier, Paraud et al. (Paraud, et al., 2014) montrent une double résistance chez les strongles présents dans deux élevages ovins à l'ivermectine et à la moxidectine administrées par voie orale.

Plus récemment, en Auvergne Rhône Alpes, le projet ParCap AuRA avait pour objectif d'apporter des solutions aux éleveurs dans leur gestion du parasitisme. L'étude portait entre autres sur l'efficacité des molécules disponibles avec une AMM caprin. Dans 13 élevages, 3 lots de 10 chèvres ont permis d'évaluer l'efficacité de l'éprinomectine pour-on et de l'oxfendazole par voie orale, en comparant à un dernier groupe témoin, non traité. Un FECRT est réalisé. Il s'avère que dans les 13 élevages, l'éprinomectine ne permet une réduction d'excrétion fécale supérieure à 95% que dans 3, et l'oxfendazole dans 2. Dans 4 élevages où les résultats étaient vraiment insuffisants, des FECRT ont été refaits, en utilisant cette fois de l'éprinomectine par voie orale ou sous-cutanée. La réduction d'excrétion fécale n'est satisfaisante que dans un cas. Cette étude montre que la situation vis-à-vis de l'éprinomectine est assez préoccupante dans les élevages étudiés, en plus de celle des benzimidazoles, déjà connue. Neuf élevages sur treize ne disposent pas d'anthelmintique efficace (Devos et al., 2022).

4) Influence de la voie d'administration sur l'efficacité des traitements et le risque de développement des résistances

Lloberas et al. ont fait une étude en 2012 portant sur deux groupes d'agneaux infestés avec une espèce d'*H. contortus* résistant à l'ivermectine l'un traité avec de l'ivermectine injectable, l'autre avec une ivermectine *per os* à posologie identique 0.2 mg/kg PV (Lloberas et al., 2012). Trois jours post traitement, les concentrations de l'ivermectine dans la muqueuse abomasale et dans les larves d'*H. contortus* sont respectivement 50 et 15 fois supérieures chez les agneaux traités avec la forme orale. En outre, le pourcentage de réduction d'œufs est de 96% avec la forme orale, contre 70% avec la forme injectable. L'administration orale d'ivermectine semble être moins favorable à l'apparition de résistance pour *H. contortus* qu'avec la forme injectable. En effet, le produit administré par voie orale arrive en totalité dans le tube digestif au contact des larves. Elles sont exposées à une plus forte concentration d'anthelmintique qu'avec une administration parentérale, qui implique une perte d'une partie du produit par la métabolisation.

Rappelons que l'éprinomectine est la seule molécule anthelmintique sans temps d'attente lait indiquée chez les chèvres (ANSES, 2021). Les auteurs Paraud, Chartier et Devos ont montré chez des caprins dans une étude datant de 2013 que l'administration par voie sous-cutanée de l'éprinomectine

rendait le traitement plus efficace qu'en pour-on. En effet, la biodisponibilité est beaucoup plus élevée dans le cadre du premier mode d'administration que dans le deuxième (Paraud et al., 2013). L'une des solutions pour limiter l'apparition de résistances pourrait déjà être d'arrêter l'administration en pour-on. Cependant, l'injection par voie sous-cutanée demande plus de temps, et paraît donc plus difficile à mettre en place dans les grands élevages.

Une étude réalisée en 2019 s'est penchée sur l'efficacité en pour-on de l'éprinomectine chez les caprins (Couasnon et al., 2019). Elle est beaucoup moins bien absorbée chez les caprins que chez les bovins. A l'heure actuelle, on ne sait pas si le léchage a une influence sur la biodisponibilité de l'éprinomectine administrée en pour-on.

Enfin, Silvestre et al., en 2007, ont étudié l'administration par voie orale et en pour-on de l'éprinomectine chez la chèvre. Ils ont d'abord évalué le rôle de l'absorption percutanée dans la variabilité d'efficacité de la molécule, en traitant deux lots de chèvres, l'un avec le dos rasé, l'autre non. Aucune différence significative n'en ressort. Ils ont ensuite comparé l'administration en pour-on à la voie orale. A J10 après traitement, les animaux traités en pour-on ont un taux de réduction d'excrétion des œufs de 90% en moyenne, alors qu'il est de 100% chez ceux traités par voie orale. Cette dernière assure une efficacité reproductible, contrairement à l'application en topique (Ijaz et al., 2009). Cependant, ce résultat ne garantit aucune efficacité en cas de réinfestation, car la rémanence de la molécule dans l'organisme est presque nulle. La meilleure biodisponibilité est obtenue lors d'injection sous-cutanée, mais comme dit précédemment, cela peut être compliqué à mettre en place (Silvestre et al., 2007). Ainsi, une administration par voie orale élimine les parasites de façon plus radicale, mais la molécule n'est pas rémanente, contrairement à la situation d'une administration parentérale.

C. Résistances aux antiparasitaires

1) Mécanismes de résistance

(Van dem Brom et al., 2013)

Le Tableau 4 présente les mécanismes de résistance retrouvés chez les strongles pour toutes les molécules étudiées. La spécificité correspond au fait que le mécanisme permettant la résistance peut ne concerner qu'un transporteur ou récepteur. La résistance est dans ce cas spécifique, parce qu'elle ne concerne qu'une cible. Dans le cas contraire, c'est une résistance non spécifique.

Tableau 4 : Mécanismes génétiques de résistance des strongles aux antiparasitaires

Familles d'anthelminthiques	Mécanismes de résistance	Spécificité
Benzimidazole	Mutations sur le gène de la beta tubuline	Cible (spécifique)
	Modifications métaboliques	Spécifique et/ou non spécifique
Lévamisole	Changement sur les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine	Cible
Ivermectine et mylbémécine	Mutations sur les gènes des récepteurs Glutamate/Chlore ou GABA	Cible
	Mutations sur le gène dyf-7 (impliqué dans la fonction sensorielle céphalique)	Cible
	ABC transporteurs (protéines transmembranaires) : surexpression	Non spécifique

Il existe une diversité génétique préexistante, avec notamment une petite proportion de parasites possédant des allèles codant pour une résistance à nos antiparasitaires. La propagation des facteurs de résistance se fait ensuite par sélection des parasites porteurs des allèles de résistances, en éliminant les parasites sensibles au traitement (Van dem Brom et al., 2013).

2) Facteurs de risque d'apparition des résistances

Lors de tout traitement anthelminthique, la population de vers résistants survivant aux effets de la molécule utilisée contribue de manière exclusive à l'émission d'œufs dans les matières fécales.

Les articles de Chartier et al. en 2015, et de Falzon et al. en 2014 présentent des facteurs de risque favorisant l'apparition de résistances :

- ✚ L'usage massif d'anthelminthiques sans précautions, a été clairement mis en évidence chez les petits ruminants comme un facteur de risque de développement des résistances. Cela correspond à un usage fréquent (Falzon, O'Neill, et al., 2014), sur tous les individus, sans

prendre garde à conserver une population refuge, c'est-à-dire une population de parasites non exposés aux molécules. Chez les bovins, 57% des éleveurs de bovins laitiers traitent leurs génisses de seconde saison de pâture (Stafford & Coles, 1999). Les raisons à cela sont les suivantes : difficulté à évaluer le risque parasitaire, faible coût des lactones macrocycliques ;

- ✚ Variabilité dans la pharmacocinétique et l'efficacité des LM en pour-on : il existe une variabilité d'absorption et un phénomène de léchage qui entrave lui-même le dépôt d'une quantité suffisante d'antiparasitaire (Bousquet-Mélou et al., 2011). Il en va de même pour la sous-exposition et le sous-dosage : une faible quantité d'antiparasitaire conduit à augmenter la pression de sélection sur les larves présentes ;
- ✚ L'utilisation de la même molécule plusieurs fois de suite (Vercruysse & Claerebout, 2001) ;
- ✚ La pratique du « drug and move », qui consiste à traiter les animaux puis à les changer de parcelle. Il est démontré que la résistance est plus élevée dans les élevages utilisant cette pratique (Falzon, O'Neil, et al., 2014).
- ✚ Le mélange d'espèces, sans que les études ne montrent de résultat significatif, tout comme la taille du troupeau, et l'emploi de formulations longue action.

L'apparition de résistance dans un élevage en raison de l'achat d'animaux parasités par des strongles résistants est une cause majeure mais sous-estimée (Falzon, O'Neil, et al., 2014).

L'usage des anthelminthiques nécessite une bonne compréhension de la pharmacocinétique, et notamment pour les molécules longue action. L'émission des œufs par les strongles adultes résistants a lieu pendant au moins la durée d'efficacité de l'antiparasitaire additionnée de la période pré-patente pour le cas des molécules rémanentes et des bolus. Cela signifie que lorsque les animaux ingèrent des larves 3 de parasites résistants, celles-ci seront capables de se développer en larves 4 puis en adultes. Ils se retrouvent donc infestés par de nouveaux adultes résistants, l'animal étant toujours sous traitement de sa molécule longue action.

La durée d'émission est augmentée lors de l'administration d'une molécule rémanente. Au bout d'un certain temps, la concentration de la molécule diminue dans l'organisme, et les parasites sont exposés à l'anthelminthique en faible quantité, ce qui contribue à la sélection d'allèles résistants dans la population. En effet, la pression de sélection sur les larves ingérées est prolongée dans le temps.

Il est nécessaire d'évaluer cette résistance, à la fois pour connaître les molécules encore efficaces, et étudier sa propagation.

D. Méthodes d'évaluation des résistances chez les strongles gastro-intestinaux

1) Infestations expérimentales

L'infestation expérimentale consiste à implanter des larves 3, pour lesquelles on suspecte une résistance, chez des individus non traités. Une fois la période pré-patente écoulée, les individus sont vermifugés, et 7 - 16 jours plus tard, selon la molécule employée, ils sont euthanasiés et autopsiés. Les strongles adultes sont comptés, et cela permet de confirmer ou d'infirmer la présence de résistance (Ijaz et al., 2009).

Ce type d'expérimentation est lourd, onéreux et pour le moment, uniquement réalisable en station expérimentale ou en école vétérinaire.

2) Le test de réduction d'excrétion fécale (FECRT)

Le principe du test de réduction d'excrétion fécale est de comparer l'excrétion fécale des œufs de strongles dans un groupe d'individus traité par une molécule donnée, avant et après traitement (Rialch et al., 2013).

Le choix du test de réduction d'excrétion fécale par rapport à d'autres méthodes est un compromis entre le coût, la facilité de réalisation et la qualité du résultat. La grande diversité des protocoles entraînant une impossibilité de comparer les résultats des expérimentations entre eux, a conduit à une harmonisation par la WAAVP (Kaplan et al., 2023). Ces recommandations englobent les conditions de facilité d'utilisation, de coût minimal, de quantité de matériel minimal, d'écoresponsabilité et de fiabilité. Elles sont développées ci-dessous.

Le test de réduction d'excrétion fécale est un test *in vivo* quantifiant la réduction de la quantité d'œufs de strongles dans les fèces des individus par un anthelmintique (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

Au préalable, pour s'assurer d'une excrétion maximale, des coproscopies quelques semaines après la sortie au pâturage sont nécessaires sur des animaux de première saison de pâture. En effet, le test n'est valable que si les animaux excrètent 150 opg au minimum. Il faut attendre 8 à 12 semaines après le dernier traitement anthelmintique pour intégrer les animaux dans une étude, 4 à 8 semaines après la fin de période de rémanence d'une molécule longue action. Il faut récupérer les fèces directement à l'orifice du rectum, et doivent être transportés frais. La dose d'anthelmintique administrée doit être parfaitement adaptée au poids des animaux. Pour réaliser un test de réduction

d'excrétion fécale, le nombre d'œufs par gramme de fèces doit dépasser un seuil minimal décrit dans des tables pour chaque espèce (Kaplan et al., 2023).

Les coproscopies doivent être réalisées sur trois types d'individus : un groupe contrôle, un groupe traité avec une première molécule, un dernier traité avec une molécule différente. Il faut réaliser des coproscopies individuelles avant et après traitement, sur des lots de 10 animaux regroupant des animaux traités avec une même molécule, et sur un lot témoin non traité. Cette méthode permet de conforter fortement la suspicion. Il est important de tenir compte du risque de réinfestation et afin d'éviter cela, il est recommandé de rentrer les animaux à l'étable après le traitement (Coles et al., 1992).

Le délai entre le traitement anthelminthique et la coproscopie n'est pas le même suivant les molécules testées : J7 pour le lévamisole, J10-14 pour les benzimidazoles, J17-21 pour la moxidectine, J14-17 pour l'ivermectine et les autres lactones macrocycliques (Chauvin et al., 2015c; Vercruyse & Claerebout, 2001). Le délai est plus long pour les lactones macrocycliques, en raison d'une inhibition de ponte quelques jours après l'administration (Rialch et al., 2013).

Le pourcentage de réduction fécale est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ réduction fécale} = 1 - \frac{\text{moyenne opg des animaux traités}}{\text{moyenne opg des animaux témoins}} * 100$$

Si le résultat est supérieur à 95%, il existe une sensibilité des populations de strongles. S'il est inférieur, on a une suspicion de résistance. Une coproculture est alors conseillée pour identifier le genre et l'espèce des strongles résistants (Chauvin et al., 2015a).

Ce test présente plusieurs limites, liées en partie à des facteurs inhérents à la biologie. Tout d'abord, s'il n'y a pas assez d'œufs dans le prélèvement, cela ne sera pas interprétable. C'est le cas pour des individus faiblement parasités, ou lors d'une excrétion fugace. En outre, la production d'œufs est densité-dépendante pour certaines espèces de nématodes. En effet, il existe des interactions négatives entre le nombre de parasites et la ponte des femelles. La composition du prélèvement en différentes espèces de parasites intervient également dans la production d'œufs. Il faut que le nombre d'animaux dans un lot et que le nombre total d'œufs comptés soient suffisamment élevés pour que les résultats soient interprétables (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

3) Tests *in vitro*

Les principaux tests *in vitro* utilisés sont le test d'inhibition d'éclosion des œufs, utilisé chez les ruminants pour évaluer la résistance aux benzimidazoles, le test de développement larvaire, et le test d'inhibition de migration larvaire.

Le test d'inhibition d'éclosion des œufs consiste à observer le pourcentage d'éclosion des œufs sous des concentrations croissantes d'anthelminthiques. Les œufs sont récupérés des fèces par lavage dans des tamis de diamètre décroissant, puis remis en suspension dans de l'eau déminéralisée. Dans l'article de Rialch et al. de 2013, 150 µL de cette suspension sont placés dans chaque puit d'une plaque de 24 puits. Sept concentrations différentes d'anthelminthique sont préparées et réparties dans les puits, le huitième puit complété avec du DMSO est un témoin. La plaque est placée à l'étuve pendant 48h, puis les œufs et larves sont comptés (Rialch et al., 2013).

Le principe de réalisation du test de développement larvaire est sensiblement le même, mais avec l'ajout d'un milieu nutritif pour les larves afin de permettre leur développement jusqu'au stade L3. L'incubation est de 7 jours, et ce sont les larves 3 qui sont comptées.

Le test d'inhibition de migration larvaire consiste à comparer la mobilité de larves exposées à une solution d'anthelminthique à tester par rapport à des larves non exposées. Par exemple, dans le protocole de Kotze et al. de 2006, les larves sont mises en contact avec une solution d'hypochlorite de sodium pour provoquer la sortie active de la larve de sa gaine protectrice, aussi appelé dégainement. Les larves sont ensuite mises en contact avec la solution à tester, préparée à 6 concentrations différentes, puis une centaine de larves sont déposées dans des puits d'une plaque à 96 puits munis de tamis à maille de 20 µm amovible. D'autres larves subissent seulement le traitement à l'hypochlorite de sodium et constituent un témoin. La plaque est placée 2h à 38°C, puis les larves ayant réussi à migrer sont comptées à la loupe binoculaire. Le résultat du test correspond au rapport du nombre de larves dites « traitées » ayant migré sur le nombre de larves « témoins » ayant migré (Kotze et al., 2006).

L'avantage de ces tests par rapport au test de réduction d'excrétion fécale est que les animaux ne nécessitent pas de traitement anthelmintique au préalable, et qu'un seul prélèvement est requis. Cependant, ce prélèvement doit être frais et transporté dans des conditions bien spécifiques et rapidement (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022). En outre, les tests *in vitro* sont plus facilement reproductibles dans la mesure où l'on s'affranchit de la problématique de la pharmacocinétique variable selon les hôtes et des différences de réponses immunes (Rialch et al., 2013).

Les tests *in vitro* ont récemment montré leur sensibilité, dans une étude réalisée par Königová et al. en 2021. Le test d'inhibition d'éclosion des œufs ainsi que le test de développement larvaire détectaient un niveau de résistance d'*H. contortus* aux benzimidazoles pour 25% d'allèles résistants. Le test de réduction d'excrétion fécale quant à lui ne mettait pas en évidence de résistance (Königová et al., 2021).

Enfin, il existe également des systèmes de lecture automatisés de mobilité des larves. Ils font intervenir des micro-électrodes qui mesurent l'impédance de signaux électriques, ce qui repère les mouvements des larves dans les puits en temps réel (Smout, Kotze, McCarthy, & Loukas, 2010).

4) Tests moléculaires

L'avancée des techniques de laboratoire, comme le séquençage haut-débit (*Next-Generation Sequencing* ou NGS), permet l'analyse fine d'un gène sur un échantillon constitué de nombreux individus. Ce type d'analyse peut présenter un intérêt dans l'étude des résistances dans 2 cas de figure. Premièrement, lors de la réalisation d'un FECRT, il peut être intéressant d'identifier les espèces de strongles avant et après traitement afin d'identifier les espèces présentes dans l'élevage mais surtout, celles qui sont résistantes et qui sont donc observées après traitement. Le gène le plus souvent utilisé pour cela est l'ITS-2 (internal transcribed spacer 2 region). Il s'agit d'une séquence d'ADN ribosomique présentant de faibles variations intra-spécifiques, mais des variations inter-spécifiques (Roeber et al., 2013). L'ITS-2 est encadré de deux régions, identiques pour toutes les espèces, qui permettent aux amorces (primer) de PCR de s'ancrer pour commencer la réplication. Le séquençage haut-débit de ce gène sur un pool d'œufs ou de larves permet donc d'identifier les espèces de nématodes présentes dans un échantillon donné (Avramenko et al., 2015).

Deuxièmement, on peut envisager d'aller rechercher directement les séquences d'ADN à l'origine des de la résistance. Pour rechercher spécifiquement les résistances, cela implique de connaître les mécanismes génétiques de résistance. A l'heure actuelle, cela est surtout utilisé pour la résistance aux benzimidazoles dont le mécanisme génétique de résistance est bien connu et relativement simple pour être recherché par des méthodes génétiques. Les principales mutations concernent l'isotype 1 de la bêta-tubuline et se situent sur les codons 167, 198 et 200 (Hodgkinson et al., 2008). Parmi les méthodes utilisées, on peut citer par exemple la technique de nested PCR, qui permet de rechercher une séquence spécifique. Dans un premier temps, c'est la séquence recherchée, connue à un endroit précis sur une séquence d'ADN qui est amplifiée, et qui sert ensuite d'amorce de réplication pour les séquences d'ADN sur lesquelles on cherche sa présence (Green & Sambrook, 2019). Le séquençage

haut-débit permet de repérer les résistances de façon plus précise et sensible. Elle a été utilisée pour séquencer le gène de la beta-tubuline sur un échantillon contenant beaucoup de larves 3, afin d'étudier les mutations sur ce seul gène au sein d'une populations de strongles (Avramenko et al., 2019). Il est aussi possible de séquencer l'ensemble du génome exploré pour chercher des régions ou des mutations encore inconnues qui expliqueraient la résistance (Avramenko et al., 2019; Richelme, 2019).

Aujourd'hui, on montre que des polymorphismes peuvent se trouver à l'origine de résistance vis-à-vis d'autres molécules, que cela soit pour *H. contortus* ou pour des espèces du genre *Teladorsagia*. Par exemple, la présence d'autres mutations sur des gènes différents a été démontrée, notamment par Doyle et al. dans leur étude en 2019. Ils ont séquencé le génome de deux populations d'*H. contortus* avec un NGS, dans le but de trouver des mutations expliquant une résistance à l'ivermectine. Ils ont mis en évidence d'importantes mutations dans une partie du chromosome V. D'autres gènes candidats font actuellement l'objet de recherches, comme Hco-glc-5, Hco-avr-14, Hco-lgc-37, Hco-pgp-2 et Hco-dyf-7 par exemple (Doyle et al., 2019).

La mise en évidence de résistances associées à un polymorphisme montre qu'il est de plus en plus difficile de lutter contre les SGI. L'augmentation du nombre de sites mutés signifie qu'un même individu peut porter plusieurs mutations qui lui permettent de résister de plusieurs manières à une molécule donnée (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

La prévalence importante des résistances montre qu'il est urgent de trouver des solutions alternatives aux traitements chimiques, qui permettent de lutter de façon durable contre le parasitisme.

III. SOLUTIONS ALTERNATIVES ET/OU COMPLEMENTAIRES AUX TRAITEMENTS ANTHELMINTIQUES DANS LA MAITRISE DU PARASITISME PAR LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX

A. Exemples de bonnes pratiques à adopter

Comme expliqué précédemment, le développement important des résistances et le faible nombre de molécules disponibles, d'autant plus dans la filière lait caprine, doit motiver des changements. A cela s'ajoute la rémanence des antiparasitaires dans l'environnement, que ce soit les

métabolites des molécules administrées par voie parentérale, ou une partie des solutions pour-on non absorbées et perdues. On note également une volonté de réduire l'usage des antiparasitaires au même titre que celui des antibiotiques. Il faut passer à une gestion intégrée du parasitisme dans laquelle l'utilisation des anthelminthiques est raisonnée, et la conduite au pâturage réfléchi. L'objectif du plan de lutte n'est pas d'éradiquer complètement les parasites sur les pâtures ou chez les animaux, mais de limiter l'impact du parasitisme à un niveau qui soit acceptable du point de vue économique. Les substances chimiques seront d'autant plus efficaces à long terme si elles sont complétées par des mesures agronomiques.

1) Gestion raisonnée du pâturage

L'objectif des mesures de conduite au pâturage est de réduire le contact entre les animaux et les larves infestantes L3 pour arriver à un équilibre entre l'hôte, le parasite, et l'environnement (Le Mer, 2017). Ainsi, l'éleveur réduit la charge parasitaire et diminue sa fréquence de traitement, tout en élevant des animaux avec une croissance correcte et/ou une production laitière satisfaisante. Il faut combiner la réduction de la densité d'animaux par hectares (stratégie de dilution), et utiliser différentes méthodes pour assainir les parcelles (Chauvin et al., 2015c).

Ces parcelles peuvent être assainies par mise au repos. En effet, la survie des larves et leur pouvoir infestant diminuent avec le temps (Le Mer, 2017). Les parcelles neuves ou les dernières non-utilisées depuis la saison précédente sont à exploiter en premier. Les parcelles peuvent être assainies par pâturage mixte ou alterné avec des bovins, n'étant pas affectés par les mêmes espèces de parasites. C'est une méthode bénéfique en théorie dont les modalités d'alternance sont encore à préciser. Pour une charge parasitaire minimale, il faudrait tourner tous les 15 jours, sans revenir à une même pâture avant 2 mois (Le Mer, 2017). Des études sur l'évolution des populations parasitaires grâce à la mise en place du pâturage dynamique chez les moutons sont en cours. Elles ciblent notamment le pâturage tournant, qui consiste à placer une forte densité d'animaux sur une petite parcelle pendant 1 ou 2 jours, et le pâturage cellulaire, avec des parcelles moins chargées et une rotation au bout de 3 à 7 jours (Le Mer, 2017). L'objectif est de limiter le surpâturage et ainsi l'arrachage par les animaux d'herbes au ras du sol et une forte infestation. En effet, les L3 infestantes sont réparties de manière gaussienne sur les 5 premiers centimètres de la pâture.

Enfin, l'assainissement peut être réalisé grâce aux pratiques culturales, et notamment avec le labour, technique considérée comme la plus efficace. Il est aussi possible de planter des haies, dont les chèvres mangent les feuilles, de façon à ce que les animaux passent moins de temps à brouter

l'herbe infestée d'œufs. La prise alimentaire est ainsi répartie entre les feuilles des haies et l'herbe, ce qui diminue l'exposition aux L3 infestantes (Chauvin et al., 2015c).

Les animaux les plus sensibles sont placés de préférence sur une pâture saine ou peu utilisée, qui sera faiblement contaminée (Chauvin et al., 2015c). Ce sont des animaux naïfs et non immuns qui recyclent beaucoup à la mise à l'herbe, et contaminent les pâtures de façon exponentielle (Le Mer, 2017). La meilleure option est de mettre ces jeunes animaux sur des dérobées après les foin, après 6 mois sans animaux en pâturage.

La dynamique parasitaire peut être étudiée via le logiciel EVA3P, du laboratoire Boehringer, qui simule la charge en L3 de la pâture, logiciel surtout utilisé chez les bovins en première saison de pâture. Les simulations permettent d'évaluer différentes stratégies de gestion des pâtures (ex : rotations de pâtures) sur le risque parasitaire. Il existe un autre logiciel pour les bovins, Parasit'Sim, qui simule le risque pour des bovins en pâture de développer une strongylose gastro-intestinale. Il est possible de paramétrer des situations-types, des conditions météorologiques ou des conduites de pâturage. Ce logiciel suit les mêmes de logiques qu'un expert, et respecte les durées de cycles parasites, la mort des larves en cas de sécheresse ou de traitement (Institut de l'élevage, s. d.). Ce sont cependant des logiciels basés sur des calculs théoriques pas toujours applicables en pratique. De plus, à ce jour, il n'y a pas de modèle disponible pour les petits ruminants (Le Mer, 2017).

2) Conseils d'usage des antiparasitaires

Un meilleur usage des antiparasitaires est préconisé pour diminuer l'apparition de résistances. Sur la base des connaissances sur les facteurs favorisant le développement des résistances, plusieurs conseils peuvent être donnés : limiter le nombre de traitements, éviter les traitements rémanents, ne pas utiliser systématiquement des molécules de la même famille, éviter le sous-dosage en alignant la dose à administrer sur l'animal le plus lourd (Learmount, Gettinby, Boughtflower, Stephens, et al., 2015), faire des traitements ciblés sur les animaux les plus excréteurs et ne pas traiter tous les animaux d'un lot (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022; Richelme, 2019).

i. Importance du maintien de populations refuges

Le fait de ne pas traiter tous les animaux d'un lot permet de créer et conserver des populations refuge de parasites (H. Drudge et al., 1964; Smout, Kotze, McCarthy, & al, 2010). Une population refuge est une population non exposée à l'anthelminthique donc non sélectionnée lors du traitement. Le refuge est un élément important à prendre en compte pour un programme de traitement durable

car il limite la pression de sélection, et donc il retarde l'émergence de populations résistantes, en conservant des parasites possédant des allèles sensibles. Il existe 3 sources de refuge qui sont les stades libres sur les pâtures, les parasites des animaux non traités, et les stades en hypobiose des parasites chez les animaux (non atteints par certains anthelminthiques) (Chauvin et al., 2015a). Différentes mesures peuvent être mises en place dans les élevages permettant de maintenir des populations refuges.

Afin de maintenir des populations refuges chez les animaux, dans l'idéal, les individus à traiter sont sélectionnés après une coproscopie, de façon à cibler les individus les plus fortement excréteurs, et selon leur état général (Learmount, Gettinby, Boughtflower, & al, 2015). Laisser une faible proportion d'individus non traités à chaque traitement suffit à freiner la diffusion de la résistance aux anthelminthiques selon certaines modélisations (Dobson et al., 2011). La taille de la population refuge dépend d'un grand nombre de facteurs, et ne repose pas sur une formule d'ordre universelle. Cela reposera toujours sur un jugement subjectif et approximatif de la situation (Learmount, Gettinby, Boughtflower, & al, 2015). L'utilisation de l'indice d'état corporel a été étudié pour cibler les individus à traiter. Dans l'étude de Cornelius et al. de 2009 en Australie, seules les brebis à la NEC inférieure à 2 étaient traitées, dans les périodes avant et après agnelage, au sevrage et au post sevrage de leurs agneaux (Cornelius et al., 2009). En comparant avec un groupe témoin, les auteurs en ont conclu que l'intensité de l'excrétion des œufs globale n'avait pas augmentée. Learmount et al. font une étude similaire en 2015 au Royaume-Uni et en concluent aussi de recommander un traitement sélectif des agneaux et des brebis à traiter basé sur la NEC (Learmount, Gettinby, Boughtflower, & al, 2015). En Ecosse, Busin et al. ont montré en 2014 qu'en traitant uniquement les agneaux avec un GMQ faible, l'utilisation des anthelminthiques est réduite de 50%, sans que la productivité de l'élevage en soit affectée (Busin et al., 2014).

Concernant les populations refuges dans l'environnement, il ne faut pas traiter au moment où le réservoir de larves infestantes sur les pâtures est minimal, car cela augmente la proportion de génotypes résistants dans les populations de nématodes : aucun « refuge » n'est laissé aux vers sensibles. L'idéal est de traiter les animaux quelques jours après leur arrivée sur une parcelle saine, pour laisser le temps aux animaux de déposer des œufs de parasites avec leurs fèces sur la nouvelle pâture, permettant ainsi de créer une population refuge, contrairement à la pratique du « drug and move » (Le Mer, 2017).

ii. Dosage et voie d'administration

Il arrive que les éleveurs n'utilisent pas les molécules aux bonnes doses, comme souligné précédemment. Un des premiers conseils devrait être d'utiliser la dose spécifique aux caprins, car c'est avec cette dose que les molécules sont efficaces sur les SGI. En effet, ces animaux ont une absorption limitée et une élimination plus rapide des molécules par rapport aux ovins. Ce constat est vérifié pour le lévamisole, les benzimidazoles et certains endectocides (Chartier, 2009).

Pour les caprins, il faut doubler la dose pour les benzimidazoles, utiliser une dose de 12 mg/kg pour le lévamisole, et l'augmenter de 50 à 100% pour les avermectines.

Il est également important d'utiliser la voie d'administration qui permette la meilleure résorption par l'organisme. Il est préférable d'utiliser la voie injectable à la voie pour-on pour l'éprinomectine (Couasnon et al., 2019).

iii. Association ou alternance de molécules

En Nouvelle-Zélande, ce sont deux anthelminthiques strongylicides qui sont administrés en même temps aux ovins dans le cadre d'un traitement (Chauvin et al., 2015c). Ils utilisent une combinaison de deux molécules strongylicides synergiques, le derquantel et l'abermectine. Dans une étude de Little et al. 2010, l'efficacité des deux molécules citées précédemment a été mise à l'épreuve dans 14 troupeaux, contenant chacun un groupe traité et un groupe témoin. Dans 9 troupeaux, d'autres groupes traités avec une autre avermectine, de l'albendazole, du lévamisole ou une combinaison des deux ont été ajoutés. L'efficacité de la combinaison derquantel-abermectine s'est montrée efficace à 100% à chaque fois, alors que les autres anthelminthiques utilisés conduisaient à une réduction d'excrétion fécale inférieure à 95%. En outre, le gain de poids associé à un traitement contenant du derquantel et de l'abermectine est significativement plus élevé par rapport aux autres groupes (Little et al., 2010).

Traiter des animaux en combinant des molécules de familles différentes est vu par certaines études comme une manière de ralentir la diffusion de résistances, alors que d'autres mettent en évidence un risque d'apparition de résistance multiples. En outre, l'alternance des familles de molécules est difficilement applicable en pratique chez les petits ruminants en raison du faible nombre de molécules autorisées et encore efficaces sur les strongles. En effet, il est inutile d'alterner un

traitement aux benzimidazoles avec des lactones macrocycliques si la première n'est plus efficace (Le Mer, 2017).

Ces bonnes pratiques de conduite au pâturage et d'usage raisonné des antiparasitaires constituent une base que tout le monde, éleveurs comme vétérinaires, devraient connaître et adopter. Il existe d'autres solutions, certes plus difficilement applicables et moins utilisées.

B. Le zéro-pâturage

Une alternative dans le contrôle de l'infestation par les SGI réside dans le zéro pâturage. Les animaux restent au bâtiment, et sont nourris exclusivement à base de paille, de foin, ou d'ensilage. Malgré cela, des parasites tels que *Skjabinema*, *Capillaria*, *Trichuris* ou *Strongyloides* sont parfois retrouvés dans les selles. Il est cependant important de noter que l'affouragement en vert, depuis des pâtures utilisées par des caprins ou des ovins au préalable, augmente le risque d'infestation par des parasites tels que les strongles gastro-intestinaux (Chartier, 2009).

Tous les éleveurs n'ont cependant pas la possibilité ni le souhait d'appliquer cette pratique. Pratiquer le zéro pâturage nécessite davantage de main d'œuvre, de matériel et de lieu de stockage du fourrage suivant ce qui est apporté, et le maintien des animaux au pâturage est souhaité d'une part pour leur bien-être des animaux et l'image de l'élevage, d'autre part pour le maintien des paysages façonnés par ces animaux.

C. Contrôle des parasites sur la pâture avec des champignons nématophages

L'utilisation de champignons détruisant les stades libres des nématodes est une approche préventive dans le contrôle de l'infestation des pâtures par des SGI. Une étude a montré en 2018 en Australie l'efficacité de *Duddingtonia flagrans* dans la réduction de l'ingestion de larves infestantes par des moutons. Des groupes pâturant sur des parcellesensemencées avec des champignons ont été comparés à des groupes contrôle, pâturant sur des parcelles normales. Les premiers groupes ont des poids plus importants comparés à leurs groupes contrôle, et le nombre d'œufs excrétés par gramme de fèces est plus important dans le groupe contrôle (Healey et al., 2018).

Par rapport aux molécules classiques, ces champignons sont efficaces sur les vers résistants aux AH, puisque leur mode d'action n'a rien à voir. Cette méthode de lutte n'est pas considérée comme chimique, mais l'on ne connaît cependant pas les produits résultant de la digestion des L3 par les champignons. En outre, l'impact environnemental de l'introduction d'une nouvelle espèce sur la microfaune locale est encore mal évalué (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

Le biocontrôle de l'infestation des pâtures est encore limité, par la variabilité des conditions météorologiques, de la charge parasitaire des parcelles au départ, ou celle des animaux. Cette technique est une alternative prometteuse, mais ne peut pas être utilisée dans n'importe quelles conditions (Healey et al., 2018).

Outre l'ensemencement de champignons, des études évaluent les bénéfices des plantes à tannins.

D. Action anthelmintique des plantes à tannins

Les propriétés anthelmintiques des plantes à tannins des familles des Fabaceae et Astareaceae sont dues à la présence de composants naturels nommés les PSMs : Plant Secondary Metabolites.

Les plantes de la famille des Fabaceae utilisées sous forme de tannins ont un rôle de perturbation du cycle biologique des nématodes, en empêchant l'éclosion des œufs, la formation de la L3 et la fécondité des femelles adultes. Ces propriétés sont dues à la présence de flavonoïdes et de polyphénols dans les tannins. Ces molécules ont soit une action « pharmaceutique-like » ou une interaction avec le système immunitaire ou le microbiote locaux (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

Les tannins sont des métabolites secondaires des plantes, de nature polyphénolique, se présentant sous forme hydrolysable (absorbés et toxiques), ou condensée (non absorbés et peu toxiques). Dans les plantes riches en tannins, on peut relever les plantes ligneuses telles que le noisetier ou le chêne, ainsi que leurs fruits. Si la concentration en tannins est de 3 à 6%, elle réduit la ponte des femelles de strongles de l'ordre de 50 à 60%, elle diminue l'installation des larves infestantes, et réduit les populations de vers déjà installées (Chartier, 2009).

Leur usage est limité car leur composition en molécules à action pharmaceutique-like dépend des conditions dans lesquelles sont cultivées les plantes, de la variété, du stade de végétation ou des parasites cibles. Aucune recommandation scientifique ne peut être établie pour cette raison pour le moment (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

En pratique, on peut conseiller à un éleveur de faire pâturer ses chèvres sur des prairies composées de plantes telles que le sainfoin, le lotier ou le sulla, ou de donner du foin type sainfoin à certains moments de l'année (Chartier, 2009).

La seconde famille de plantes, les Astareaceae, dont on peut citer l'endive (*Cichorium intybus*), est composée d'espèces riches en guaianolide, également de la catégorie des polyphénols.

Les racines d'endives montrent des propriétés anthelminthiques intéressantes, en utilisant la pulpe obtenue après extraction de l'inuline. Une étude de Peña Espinoza et al. en 2020 montre que les molécules extraites de cette façon contribuent à diminuer la motilité des nématodes. Cette méthode doit encore être explorée, comme d'éventuelles autres méthodes d'extraction (Peña-Espinoza et al., 2020).

Une dernière démarche consiste à combattre le parasitisme directement depuis l'individu.

E. Sélection d'animaux génétiquement résistants

On précise que la résistance d'un animal correspond à sa capacité à réduire l'installation, le développement, la fécondité et la survie des vers. La résilience est pour un animal sa capacité à maintenir son niveau de production malgré l'infestation par des SGI.

On constate une variation génétique de résistance aux parasites entre les races de petits ruminants et entre les individus. Par exemple, les races dont le berceau génétique est une région où la pression de transmission est très importante à l'image des régions tropicales, sont plus résistantes et résilientes que celles dont ce n'est pas le cas, comme les races européennes. Gruner et al. 2003 montrent que les individus de race Martinik Black Belly sont plus résistantes à *H. contortus* que ceux de race INRA 401 (Gruner et al., 2003).

Les mêmes auteurs montrent la présence de variations génétiques notables entre individus de race INRA 401 (Gruner et al., 2004), et au sein de la race Merinos (Woolaston & Piper, 1996). Leurs études basées sur l'héritabilité du caractère « excrétion des œufs » met en évidence la possibilité de sélectionner des individus sur ce critère, de façon à diminuer la pression parasitaire. Cependant, il est observé qu'en Australie, il faut 8 à 10 ans de sélection de lignées de moutons résistantes à *H. Contortus* avec d'avoir une différence significative d'excrétion d'œufs avec un troupeau témoin.

L'haplotype de l'intron 1 du gène de l'IFN gamma est étudié pour sa probable responsabilité de résistance aux SGI, ainsi que le polymorphisme du gène DRB1 pour l'intensité d'excrétion des œufs.

Au Royaume-Uni, une sélection par génotypage sur le locus DRB1 a débuté au Royaume-Uni dans le cadre de dispositifs expérimentaux, mais cela reste encore au stade de la recherche (Chartier, 2009).

Cependant, le modèle n'est pas parfait. Les moutons sélectionnés sur leur résistance à l'infestation par des strongles peuvent présenter une importante réponse inflammatoire lors d'une

éventuelle infestation par des SGI. Cela conduit à une baisse de l'état général marquée des animaux concernés, et est contre-productif quant à l'effet recherché (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

F. Application par les éleveurs... ou pas

Si la première étape de la lutte contre la résistance des SGI aux anthelminthiques est la mise en place de méthodes efficaces et de modèles fonctionnels, encore faut-il que les éleveurs les appliquent. Les méthodes de gestion durables du parasitisme ne sont appliquées par les éleveurs que si elles respectent leurs critères de praticité. Ils acceptent en général facilement de laisser une partie de la population non traitée, mais ils sont moins enclins à traiter selon le compte d'œufs dans les fèces, ou de peser les animaux régulièrement. Cela se comprend car ces mesures nécessitent du temps pour être appliquées, et les éleveurs sont souvent déjà surchargés de travail (Charlier, Bartley, & Sotiraki, 2022).

L'un des éléments clés pour l'adoption de ces mesures est la compréhension par les principaux acteurs de l'enjeu de la problématique de la résistance aujourd'hui. Le vétérinaire est perçu comme la personne référente quand toute demande d'information s'impose. Les éleveurs ne se sentent pas responsables de la mise en place de mesures de gestion, et ont besoin d'être guidés par leur vétérinaire.

**PARTIE 2 : ETUDE DES RESISTANCES DANS LES ELEVAGES
CAPRINS EN REGION AUVERGNE-RHONE-ALPES A L'AIDE DE
TESTS *IN VITRO***

Les études menées jusque-là sur le niveau général de résistance des strongles des caprins aux antiparasitaires en Europe et en France ont montré un niveau élevé de résistance des strongles gastrointestinaux aux antiparasitaires. Comme évoqué dans la première partie, beaucoup d'élevages ne peuvent plus être traités aux benzimidazoles. La résistance aux lactones macrocycliques est très disparate selon les endroits. Certains élevages n'ont pas vu leur efficacité diminuer, tandis que d'autres présentent une résistance à deux molécules de cette famille, l'ivermectine et la moxidectine (Paraud et al., 2013). Cependant, la littérature est pauvre et les études s'intéressant aux résistances des SGI chez les caprins sont peu nombreuses et récentes.

Afin d'avoir des connaissances plus récentes et précises sur l'étendue de la résistance des strongles des caprins aux anthelmintiques, nous avons mis en place un test *in vitro* pour évaluer l'efficacité des anthelmintiques que nous avons ensuite utilisé pour établir le profil de résistance des parasites dans plusieurs élevages de caprins de la région Auvergne-Rhône-Alpes.

Nous nous sommes orientés vers la réalisation de tests *in vitro* plutôt que sur des tests classiques de FECRT car cette étude s'intègre dans le projet Par'Cap financé par un programme PEPIT de la région Auvergne-Rhône-Alpes. Le but de ce projet était d'apporter des solutions aux éleveurs de caprins à la problématique du parasitisme herbager. Le LDA est le test de choix car c'est un test plus pratique à mettre en œuvre sur le terrain, car ne nécessitant que la réalisation de prélèvements de fèces à un moment. Il est en outre plus sensible pour détecter les résistances qu'un test de réduction d'excrétion fécale. Ce protocole est basé sur un protocole de l'INRAe (Hubert & Kerboeuf, 1992), et du travail d'une thèse d'un précédent étudiant (Mongellaz Clément, 2019). Le travail expérimental a été réalisé en automne 2020 avec l'aide de Saribulbul Nur-Efsan, stagiaire en BTS Bioanalyses et Contrôles.

I. MATERIEL ET METHODE

A. Sélection des élevages

Les animaux choisis pour l'étude étaient exclusivement des caprins ayant accès au pâturage. Ils avaient au minimum 6 mois pour garantir un niveau d'excrétion fécale minimum, et ils ne devaient pas avoir été déparasités dans les 2 mois précédant le prélèvement (Dolinská et al., 2013).

B. Prélèvements et coproscopies

Les prélèvements ont été réalisés en octobre 2020 à la rentrée des animaux à l'étable. Des fèces fraîches ont été récupérées sur le sol, ou recueillies directement en intra-rectal. Pour chaque élevage, il y avait 10 échantillons prélevés au hasard dans le lot (George et al., 2017).

Les fèces étaient placées dans des sachets hermétiques, en prenant soin d'enlever le maximum d'air avant de fermer le sac conditions, afin de mettre les fèces en condition anaérobie, ce qui permet de limiter le développement des œufs. Le colis des échantillons était ensuite envoyé jusqu'à VetAgro Sup à température ambiante. Le délai moyen entre le prélèvement dans la ferme et l'arrivée des prélèvements à VetAgro Sup était de 48h.

Dans un premier temps, une analyse coproscopique de McMaster était réalisée pour établir un nombre d'œufs par gramme de fèces (opg) (George et al., 2017). Cette analyse était faite dans la journée suivant l'arrivée de l'échantillon au laboratoire, de façon à limiter l'éclosion des œufs et optimiser l'exploitation du prélèvement. Pour cela, après une homogénéisation des fèces, 70 mL de solution de chlorure de sodium saturée ($d = 1,2$) sont ajoutés à 5g du mélange de fèces. Le mélange œufs/solution est homogénéisé et filtré au travers d'une compresse de gaze sur une passoire. Quelques gouttes du filtrat servent à remplir la cellule de McMaster. Le liquide dense permet aux œufs, moins denses, de remonter à la surface de la fine lame de liquide contenu dans la cellule de McMaster. Les œufs sont comptés à l'objectif x10 du microscope. Le dénombrement se fait comme suit : chaque cellule de la lame contient un volume de 0,5 mL de solution de fèces. La lame composée de deux cellules contient donc 1 mL de liquide, soit 1/15e du mélange fait au préalable. Le nombre d'œufs compté dans les deux cellules est donc multiplié par 15, ce qui donne le résultat en œufs par gramme de fèces (opg) (Zajac & Conboy, 2012).

En parallèle, nous préparions une lame de contrôle en remplissant un tube à essai à ras bord de façon à obtenir un ménisque, sur lequel nous posons une lamelle. Ainsi, lors de la centrifugation (1500 tours/min pendant 5 minutes), les œufs remontent sur la lamelle. L'observation de cette lame permet de détecter des éléments parasitaires peu nombreux ou de petite taille qui pourraient ne pas être détectés sur la lame de McMaster.

Déterminer la concentration d'œufs de strongles dans les fèces permettait de déduire la masse minimale de fèces à analyser par la suite pour réaliser le test. Sachant que nous travaillions avec des plaques de 24 puits, avec une quantité de 100 œufs par puit, il fallait un total de 2400 œufs par élevage

et par test. En divisant par le nombre d'œufs par gramme de fèces, nous avons la masse de fèces à utiliser, à majorer en raison de pertes à prévoir lors du processus d'extraction.

C. Extraction des œufs de strongles gastro-intestinaux

Le protocole d'extraction des œufs de strongles est basé sur celui décrit dans la thèse de Bertocchi (Bertocchi, 2019). En réalisant les expérimentations, nous remarquons un fort taux de mortalité des larves. Nous avons insisté sur le rinçage des œufs après les étapes de flottation sur sel et du gradient de saccharose.

- Le tamisage

La première étape consiste en des passages successifs des fèces dans des tamis de maillages décroissants. Les prélèvements sont mélangés avec un peu d'eau, et écrasés afin d'obtenir un ensemble homogène. Le tout est placé sur le tamis à mailles de 250 μm , et aspergé d'eau, afin de retenir les plus gros résidus et laisser passer les œufs. Le filtrat est récupéré dans un seau puis l'opération est reproduite avec le tamis à mailles de 100 μm , puis avec le tamis à maille de 25 μm . Arrivé à ce dernier, la taille des œufs de strongles étant supérieure à 50 μm , ils sont retenus sur le tamis et ainsi récoltés.

- La centrifugation

Les œufs précédemment filtrés sont mis dans un bécher de 150 mL en rinçant minutieusement le tamis à l'eau du robinet. Le contenu du bécher est versé dans des tubes Falcon de 50 mL, qui sont mis à centrifuger pendant 7 minutes à 1500 tours/min. Le surnageant est enlevé à l'aide d'une pipette Pasteur de 3 mL en polyéthylène jusqu'au culot.

- Flottation sur sel

Une solution de NaCl ($d=1,18-1,20$) est ajoutée au culot, de façon que la solution salée représente au moins 9/10^e du total en proportion. Si le volume du culot est compris entre 5 et 10 mL, il est d'abord réparti dans deux tubes Falcon avant d'ajouter la solution de NaCl. Les solutions obtenues sont passées à la centrifugeuse pendant 7 minutes à 1000 tours/min. Les œufs vont alors remonter à la surface car ils sont de plus faible densité que la solution de NaCl.

Les œufs, à la surface, sont récupérés à l'aide d'une pipette Pasteur. Ils sont mis sur un tamis à mailles de 20 μm , rincés à l'eau du robinet puis avec de l'eau distillée. Suite à des niveaux de développement des œufs et des larves, nous avons été particulièrement vigilants sur cette étape de rinçage pour

éliminer complètement le NaCl. En effet, une teneur trop élevée en sel pourrait expliquer les faibles niveaux de développement parfois obtenus. Les œufs sont finalement récoltés avec l'eau distillée dans un bécher de 100 mL.

- Gradient de saccharose

Suivant le protocole décrit dans la thèse de Bertocchi en 2019 (Bertocchi, 2019), nous préparons 3 solutions sucrées de densités différentes, dont les photos sont présentes en Figure 5 :

- Mélanger 10 mL de solution mère avec 90 mL d'eau distillée dans un récipient de 100 mL. Puis ajouter 2 gouttes de colorant alimentaire jaune pour obtenir la **solution Fa** ;
- Mélanger 25 mL de solution mère avec 75 mL d'eau distillée dans un autre récipient de 100 mL. Puis ajouter 2 gouttes de colorant alimentaire rouge pour obtenir la **solution Fb** ;
- Mélanger 40 mL de solution mère avec 60 mL d'eau distillée dans un troisième récipient de 100 mL. Puis ajouter 2 gouttes de colorant alimentaire bleu pour obtenir la **solution Fc** ;
- Pour réajuster la densité de Fb nous prélevons 3 fois de suite 1 mL de Fb pour le remplacer par 1 mL de solution mère.

Figure 5 : Solutions de saccharose de différentes densités (production personnelle)



Fa

Fb

Fc

Solution mère
restante

Nous déposons ensuite successivement ces 3 solutions de saccharose dans un tube Falcon, avec des pipettes de 10 mL, la plus dense au fond, comme sur la Figure 6 : Dépôt d'un gradient de saccharose dans un tube Falcon (production personnelle)Figure 6.



Figure 6 : Dépôt d'un gradient de saccharose dans un tube Falcon (production personnelle)

Une suspension d'œufs est ensuite déposée doucement sur le gradient de saccharose, à l'aide d'une pipette. Le tube est centrifugé pendant 7 minutes à 1000 tours/min. Les œufs se retrouvent alors à l'interface entre les solutions rouge et jaune. Nous les aspirons puis déposons sur un tamis à maille de 20 μm et les rinçons avec de l'eau du robinet. L'ensemble est récupéré dans un bécher avec de l'eau distillée.

Pour les étapes suivantes, la concentration en œufs dans l'échantillon doit être de 1 œuf/ μL . Pour déterminer la concentration en œufs, on prélève 3 fois 10 μL de solution, déposés sur une lame, pour compter le nombre d'œufs au microscope optique. Le nombre d'œufs par μL est le nombre d'œufs comptés sur les trois prélèvements, divisé par 30. Si la concentration en œufs est trop faible, le filtrat est à nouveau centrifugé et du surnageant est retiré. Si elle est au contraire trop élevée, de l'eau distillée est rajoutée dans la solution.

D. Préparation des solutions d'anthelmintiques

Dans cette étude, 3 anthelmintiques étaient testés : le thiabendazole (TBZ >99%, powder, T8904, laboratoire Sigma Eldritch), l'éprinomectine (Eprinex multi pour on® 5mg/ml) et le tétramisole (TET, L9756, laboratoire Sigma Eldritch).

Les anthelminthiques bruts servaient à fabriquer des solutions mères, en les dissolvant dans une solution pure de DMSO pour le thiabendazole, ou dans de l'eau distillée pour l'éprinomectine et le tétramisole. Puis, en les diluant dans les solvants correspondants, 10 concentrations sériques pour chaque anthelminthique étaient préparées à partir de ces solutions mères.

La valeur des concentrations a été déterminée avec l'appui de plusieurs études ayant utilisé des protocoles similaires. Le tableau ci-dessous (Tableau 5) synthétise les concentrations retrouvées. On notera la diversité des valeurs suivant les études.

Tableau 5 : Intervalles de concentrations en anthelminthiques testées dans différentes études chez les ovins

Article	[Thiabendazole]	[Ivermectine]	[Lévamisole]
Hubert and Kerboeuf, 1992 (Hubert & Kerboeuf, 1992)	0.005 à 2.580 µg/mL	0.0002 à 0.06 µg/mL	0.005 à 2.580 µg/mL
Amarante et al., 1997 (Amarante et al., 1997)	0.008 à 0.1 µg/mL	0.009 à 0.08 µg/mL	0.12 à 1.17 µg/mL
Dolinska et al., 2013 (Dolinská et al., 2013)		IVM : 0.021 à 43.4 ng/mL	
Mickiewicz et al., 2020 (Mickiewicz, Czopowicz, Kawecka-Grochocka, & al, 2020)	0.0006 à 1,28 µg/mL	IVM – aglycone : 0.084 à 173 ng/mL	0.02 à 32 µg/mL
Mongellaz, 2019 (Mongellaz Clément, 2019)	0.007 à 0.13 µg/mL	0.003 à 0.05 µg/mL	

Les concentrations que nous avons utilisées sont donc choisies en fonction des fourchettes citées dans les articles du Tableau 5, et de l'organisation de la plaque de puits de l'expérimentation.

Les voici :

- Thiabendazole : 0.02 à 1.5 µg/mL
- Eprinomectine : 0.2 à 200 ng/mL
- Lévamisole : 0.06 à 4 µg/mL

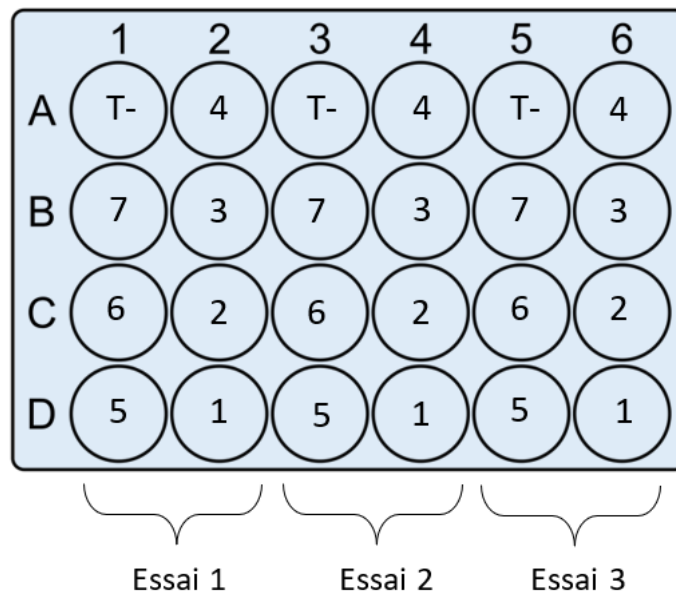
Ces solutions étaient ensuite aliquotées par 200 µL puis stockées pour une utilisation future au congélateur à – 20 °C pendant une durée de 15 jours maximum.

E. Test de développement larvaire

Le test de développement larvaire a été conduit dans des plaques de 24 puits. Chaque essai était reproduit en triplicat, dans le but de tenir compte de la variabilité entre les puits. Nous avons tenté de faire les cultures dans des plaques de 48 et 96 puits, mais le milieu séchait très vite, ou le taux de développement était très inférieur à celui attendu.

Le schéma de plaque adopté est présenté sur la Figure 7. Les puits « T – » correspondent aux puits témoins, les numéros des puits correspondent à une concentration d'anthelminthique. Par exemple, la concentration n°7 était la moins concentrée pour le lévamisole.

Figure 7 : Schéma du plan de plaque de l'étude



En se basant sur les différentes publications sur le sujet, les essais réalisés dans l'établissement par des stagiaires et des étudiants en thèse, le test a été réalisé dans le milieu suivant (volumes par puit) :

- 100 μL de solution de suspension d'œufs (cf partie I.B)
- 20 μL de solution d'*E. coli*
- 10 μL de solution d'amphotéricine B
- 10 μL de solution de Yeast/Earle (cf annexe 4)
- 40 μL de solution d'anthelminthique (cf annexe 4)
- 170 μL d'eau distillée

❖ Détermination de la concentration en amphotéricine :

L'amphotéricine (SIGMA, A2942) était aliquotée dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, préparée pour plusieurs manipulations et conservée au congélateur, à -20°C . Les valeurs de concentrations dans les puits variant beaucoup dans la littérature (Tableau 6), nous avons fixé une valeur de $3.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans le puit, soit un ajout de 4 μL d'amphotéricine à $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tableau 6 : Valeurs de concentration en amphotéricine dans la littérature

Référence	Concentration en amphotéricine dans le puit ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Hubert and Kerboeuf, 1992 (Hubert & Kerboeuf, 1992)	2,67
Demeler et al., 2010 (Demeler et al., 2010)	33
Mickiewicz et al, 2020 (Mickiewicz, Czopowicz, Kawecka-Grochocka, & al, 2020)	0,33
Protocole INRA 2022	10

Le remplissage des puits avec les différentes solutions s'effectuait sous hotte aspirante, avec des micropipettes et des cônes à usage unique.

Le premier jour, les œufs étaient déposés dans le puit avec l'eau distillée. Le second jour, nous ajoutons les solutions d'*E. coli*, d'amphotéricine B et de Yeast-Earle. Le 3^{ème} jour, la solution d'anthelminthique choisie était ajoutée, pour les puits non-témoins. A chaque phase, les plaques étaient agitées afin de réhomogénéiser le contenu du puit. Pour une certaine concentration d'anthelminthique, un même aliquot de 600 μL servait à remplir les puits correspondants. Une fois la quantité de solution ajoutée, le cône ayant servi à remplir les puits était utilisé pour homogénéiser le contenu du puit en l'aspirant puis le refoulant.

Nous avons fait des premiers essais en mettant la solution nutritive et les bactéries le premier jour en même temps que les œufs, mais les résultats étaient vraiment décevants. L'essai de rajouter ces éléments 48h après le dépôt des œufs n'améliorait rien.

Une fois les puits remplis, les plaques de culture étaient scellées avec un film extensible afin d'éviter au maximum le dessèchement des puits. Elles étaient ensuite placées à l'étuve à 25°C pendant 9 à 13 jours, le temps que les œufs éclosent, puis que les larves mûrissent jusqu'en L3.

Au bout du temps d'incubation, les œufs, les L1-L2 et les L3 de chaque puit sont dénombrés, par observation au microscope inversé (Figure 8). Ces nombres sont obtenus en 3 fois pour chaque concentration d'anthelminthique et puit témoin. La L3 se différencie de la L2 par la présence d'une gaine, qui donne une impression de petit « bourrelet » dans les zones de flexion de la larve.

Figure 8 : Photographie de L3 en fin de LDA (production personnelle)



Afin que les résultats des expérimentations soient interprétables, nous avons veillé à avoir un taux de développement des larves suffisant dans les puits, en se basant sur plusieurs publications (Demeler et al., 2010; Hubert & Kerboeuf, 1984, 1992). Les valeurs sont reportées dans le Tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Pourcentages de développement des œufs jusqu'au stade L3 dans quelques publications

Publication	%développement L3
Demeler et al.	80-87%
Hubert et Kerboeuf (1992)	85%
Hubert et Kerboeuf (1984)	64-71%

F. Correction des données

Pour tenir compte de la variabilité des expérimentations, nous ramenons la proportion de larves écloses dans un puit à celle du puit témoin, via la formule suivante :

$$\frac{\frac{L3\ C}{Total\ C}}{\frac{L3\ T}{Total\ T}}$$

- L3 C : nombre de L3 en fin d'expérimentation dans le puit testé
- Total C : nombre de larves et d'œufs en d'expérimentation dans le puit testé
- L3 T : nombre de L3 en fin d'expérimentation dans le puit témoin

Total T : nombre de larves et d'œufs en d'expérimentation dans le puit témoin

G. Classification de la sensibilité des strongles

Le but des expérimentations est de déterminer le profil des parasites, sensible ou résistant. Nous testons un grand panel de concentrations d'anthelminthique, que nous comparons aux doses discriminantes, *i.e.*, doses à partir desquelles moins de 1% de larves ne se développe (DL99%).

Les valeurs référencées chez les ovins sont présentées dans le Tableau 8 ci-dessous, en µg /mL. Ces données sont supposées valables pour les caprins, puisqu'ils sont parasités par les mêmes espèces de strongles que les ovins.

Tableau 8 : Valeurs référencées de dose létale discriminante chez les ovins, en mg/mL

Publication	Thiabendazole	Lévamisole
Coles et al., 2006	0,02	
Mickiewicz et al., 2021	0,08	2

Concernant l'éprinomectine, il n'y a pas de seuil donné dans la littérature. Cependant, d'après l'étude de Dolinska et al. de 2013, nous pouvons proposer une valeur de dose discriminante. Ils ont étudié deux souches d'*H. contortus* sensibles et cinq résistantes. Sur ces souches résistantes, la plus petite valeur de DL99% obtenue est de 15.05 ± 2.236 ng/mL pour les souches résistantes. Nous choisissons donc un seuil à 12,5 ng/mL (Dolinská et al., 2013).

II. RESULTATS ET INTERPRETATION

A. Comptage et mise en forme des résultats

Le premier critère d'inclusion des élevages était lié au résultat de l'analyse coprologique préliminaire. Seuls les élevages avec au moins 300 œufs par gramme (opg) de fèces ont été considérés. Les résultats de coproscopie sont présents dans le Tableau 9 ci-dessous. Des essais de culture ont été réalisés sur les prélèvements de plusieurs élevages, mais seuls 3 ont correctement fonctionné et étaient interprétables.

Tableau 9 : Résultats des coproscopies préalables

	Nombre d'œufs SGI/cellule de comptage		OPG
Elevage 1	19	20	585
Elevage 2	13	17	450
Elevage 3	12	8	300

Les 3 tests sont notés respectivement « élevage 1 », « élevage 2 » et « élevage 3 ».

Les comptages des plaques de l'élevage 1 sont présentés sous forme de tableau représentant le plan de plaque, l'un des tableaux est présent en annexe 5.

Les développements relatifs des larves 3 sont regroupés dans un tableau, avec les concentrations d'anthelminthiques dans les puits correspondants. A partir de ce rassemblement de données sont tracés

les courbes de régression non linéaire du pourcentage de survie en fonction du logarithme décimal de la concentration d'anthelminthique dans les puits, couramment utilisées en toxicologie pour représenter un phénomène de dose réponse.

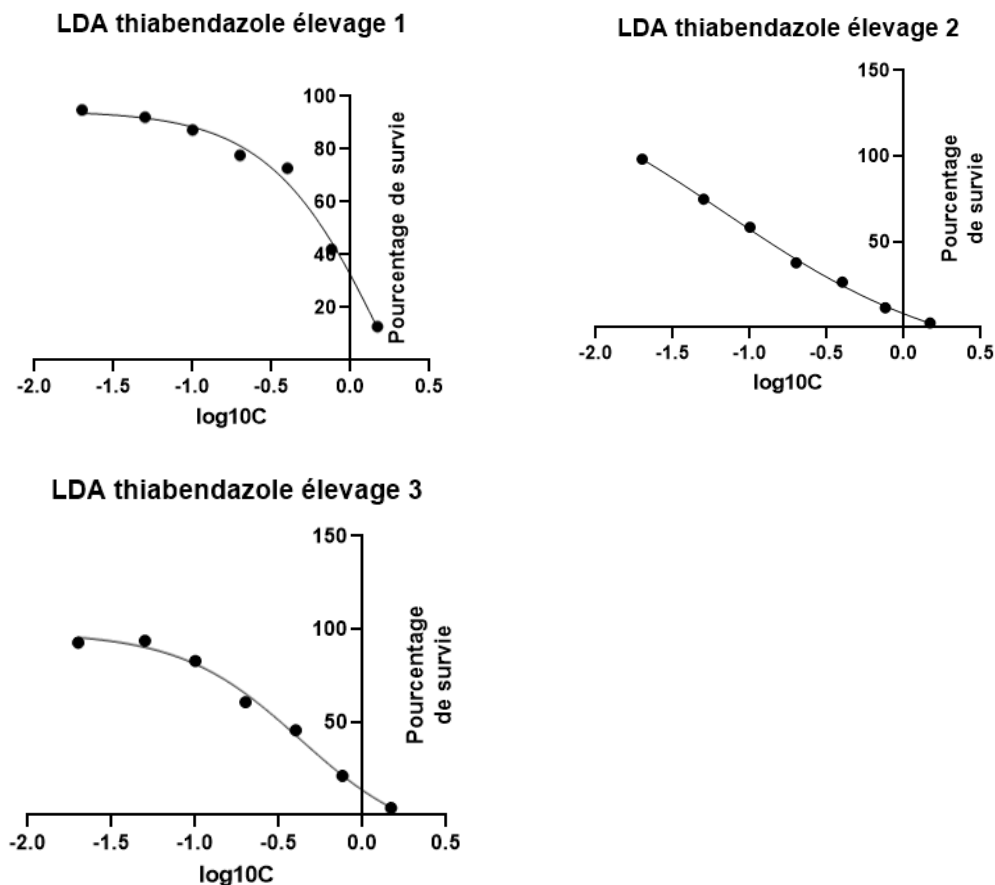
B. Résultats de LDA

Nous comparons les valeurs de concentrations d'anthelminthique dans les puits pour lesquelles les larves ne se sont pas développées aux valeurs de doses discriminantes de la littérature.

1) Thiabendazole

La Figure 9 ci-dessous représente les résultats de développement larvaire lors de culture en présence de thiabendazole.

Figure 9 : Pourcentage de développement larvaire obtenus en présence de thiabendazole



Les résultats sont relativement homogènes entre les répliquats (ANNEXE 6). Pour tous les élevages, nous pouvons noter qu'il y a parfois un fort taux de mortalité des œufs, jusqu'à 20% pour quelques puits.

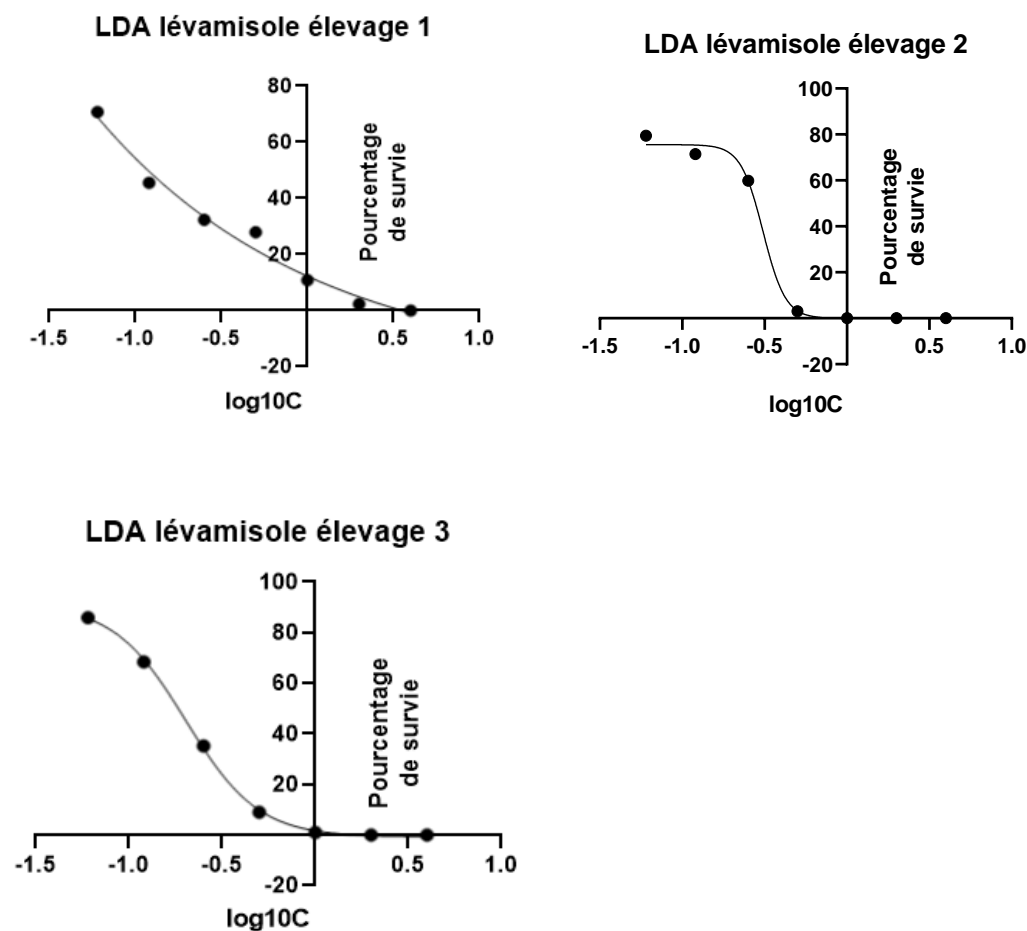
Globalement, plus la concentration d'anthelminthique augmente, moins les larves ne se développent. Suivant les élevages, la décroissance du développement larvaire n'est pas la même. En effet, à une même concentration, le développement larvaire de l'élevage 1 est supérieur à celui de l'élevage 3, lui-même supérieur à celui de l'élevage 2. Ceci est observable pour les trois répliquats. La décroissance du développement larvaire est donc moins marquée pour l'élevage 1. Le développement larvaire n'est inhibé que dans un répliquat d'un seul élevage, à la concentration de 1,5 µg/mL.

Dans la littérature, la dose discriminante retenue pour le thiabendazole est de 0.08 µg/mL. Pour les trois élevages, le développement larvaire se fait à cette concentration, et aux concentrations plus élevées. Pour une concentration de 0.1 µg/mL, nous avons respectivement pour les élevages 1, 2 et 3 un développement larvaire de 87.3%, 58.6% et 82.8% en moyenne sur les 3 répliquats. Les élevages étudiés présentent donc une résistance au thiabendazole.

2) Lévamisole

La Figure 10 illustre les résultats de développement larvaire en présence de lévamisole.

Figure 10 : Pourcentage de développement larvaire obtenus en présence de lévamisole



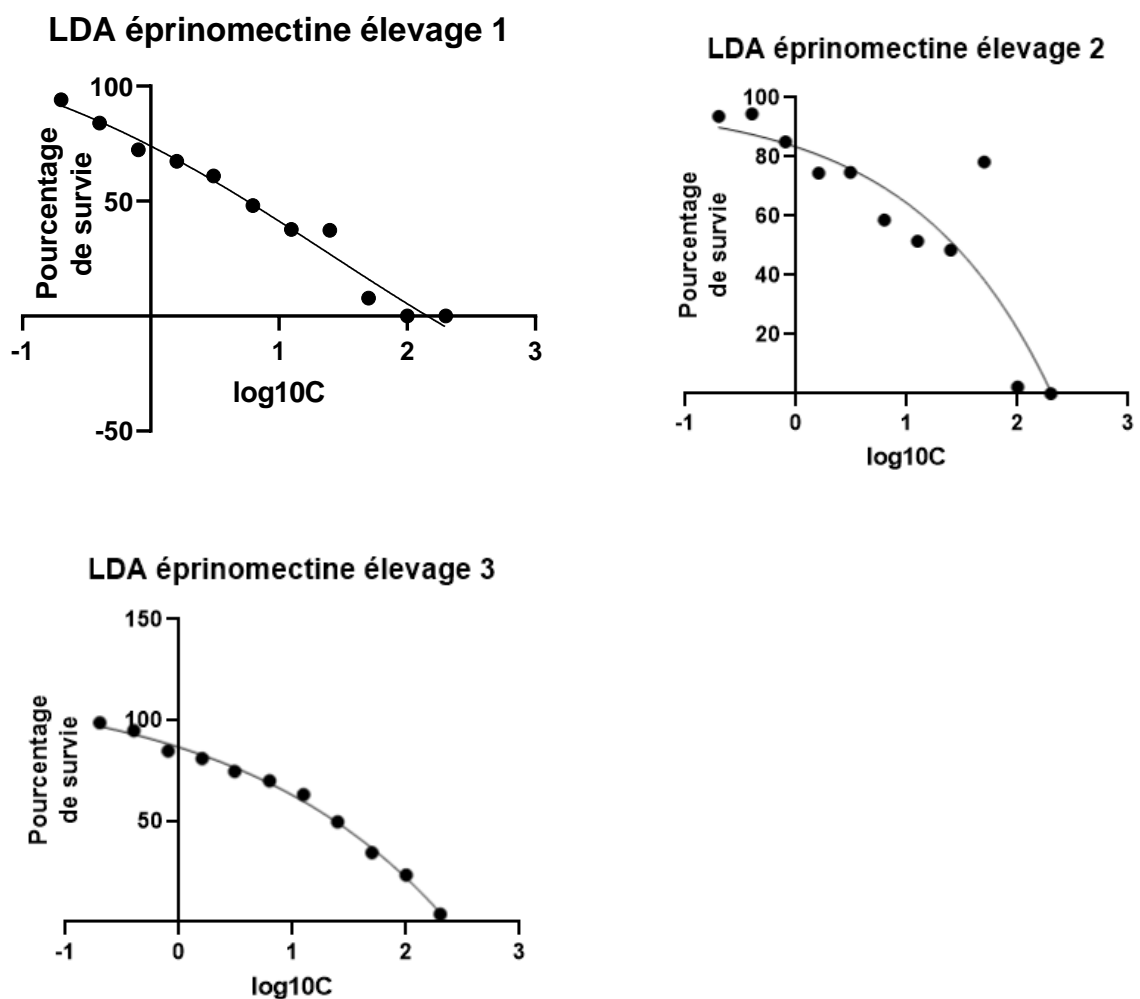
Les résultats sont homogènes entre les répliquats (ANNEXE 7). Les résultats sont plus mitigés en ce qui concerne le lévamisole. Le développement larvaire est nul pour l'élevage 2 à partir de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pour l'élevage 3 à partir de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, et pour l'élevage 1 à partir de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Pour le lévamisole, la dose discriminante est de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les expérimentations de l'élevage 1 montrent que les larves parviennent à se développer à une telle concentration. Le développement larvaire est d'environ 2.37%. Pour les deux autres élevages, les puits aux concentrations égales et supérieures à la dose discriminante sont vides de larves de stade 3. La molécule semble donc efficace dans les élevages 2 et 3, mais nous pouvons suspecter un manque d'efficacité du lévamisole dans l'élevage 1.

3) Eprinomectine

La Figure 11 représente les résultats de développement larvaire en présence de l'éprinomectine.

Figure 11 : Pourcentage de développement larvaire obtenus en présence de l'éprinomectine



Les résultats sont bien homogènes entre les 3 répliquats (ANNEXE 8). Pour les trois élevages, la décroissance de développement larvaire est globalement homogène. Une singularité est à noter pour l'élevage 2. Les larves se développent de moins en moins avec l'augmentation des concentrations comme attendu. Puis, à la valeur de 50 ng/mL, les larves se développent aussi bien que dans le puit témoin pour deux répliquats. Ainsi, les valeurs de développement larvaire sont élevées et chutent, elles passent d'environ 50 % à 0% sur deux échelles de concentration. Les deux autres élevages observent la même tendance entre eux.

Le développement larvaire est totalement inhibé pour le premier élevage à partir de 100 ng/mL, de 200 ng/mL pour le second, et pour l'élevage 3, les larves ne sont absentes que d'un triplicata à 200 ng/mL. Ainsi, les parasites se développent jusqu'au stade L3 à la concentration de 12,5 ng/ml –considérée ici comme dose discriminante–, et au-delà. En effet, à la concentration de 12.5 ng/mL, le développement relatif des larves dans les puits des élevages 1, 2 et 3 est respectivement de 37.7%, 51.3% et 63.1%. Les larves des trois élevages étudiés semblent donc résistantes à l'éprinomectine, selon la dose discriminante choisie.

III. DISCUSSION

Dans ce travail de thèse, nous avons voulu évaluer le statut de résistance des strongles digestifs à 3 familles d'anthelmintiques dans des élevages de caprins de la région Auvergne-Rhône-Alpes. Nous avons pour cela utilisé un test de développement larvaire (LDA). Ce LDA a révélé une résistance totale des trois élevages au thiabendazole et à l'éprinomectine. Les résultats sont moins tranchés pour le lévamisole, et seul l'un des 3 élevages, l'élevage 1, est résistant. Cependant, les résultats du LDA avec l'éprinomectine sont explorateurs et nécessitent d'autres investigations pour conforter ces résultats ou non.

Nous n'avons de résultats que sur trois élevages pour plusieurs raisons : un certain nombre de plaques se sont retrouvées inexploitable pour cause de sécheresse prématurée des puits, ou à cause de la forte densité en matière organique au fond du puit, qui gênait grandement la lecture. Pour certains élevages, il a également été impossible de procéder à la mise en culture en raison de la trop faible concentration en œufs. Nous allons étudier point par point tous les éléments qui pourraient être améliorés pour de futures études similaires.

A. Prélèvements de fèces et coproscopies

Afin d'assurer l'absence totale de contamination des prélèvements ; les fèces doivent être prélevées en intra-rectal, ou directement à la sortie du rectum. Il faut éviter tout contact avec le sol, car les nématodes libres vivant dans les pâtures remontent très vite dans les excréments. N'étant pas présents lors du prélèvement, car les éleveurs le réalisaient seuls, nous ne pouvions pas vérifier ce point.

Pour une étude, il faut prélever 10 à 15 animaux (George et al., 2021), et cela parfois à plusieurs reprises. En effet, il faut dans un premier temps vérifier que les individus de l'élevage sont suffisamment excréteurs avec une coproscopie, et éventuellement recommencer si l'expérience échoue. Ces prélèvements demandent du temps et une organisation supplémentaire à l'éleveur, et beaucoup d'élevages testés avaient un faible niveau d'excrétion en œufs, ce qui explique le faible nombre d'élevage recruté. Il faut également prendre en compte le temps que nous mettons au laboratoire pour exploiter les œufs d'un seul élevage.

Les fèces étaient portées au laboratoire parfois le matin, parfois la veille suivant la disponibilité de l'éleveur, mais nous n'avons pas vu de différence d'état de conservation des œufs d'une manipulation à une autre. Ils étaient toujours en bon état et parfaitement reconnaissables.

B. Extraction des œufs de strongles gastro-intestinaux

Les prélèvements de fèces étaient souvent pauvres en œufs, il fallait donc en prendre une grande quantité, parfois jusqu'à 200g, pour être assurés d'avoir suffisamment d'œufs pour effectuer toutes les manipulations. L'eau nécessaire pour laver correctement l'intégralité du prélèvement remplissait le seau entier. Cette étape est d'autant plus rallongée qu'il y avait 3 tamis successifs à passer.

Une fois le tamisage effectué, il était difficile à ce stade de contrôler la quantité d'œufs en examinant un échantillon au microscope en raison du nombre de débris. Les étapes suivantes de flottation au sel et de concentration sur gradient de saccharose permettaient l'élimination de la plupart des débris organiques.

Cependant, une fois arrivés au moment final de mesure de la concentration en œufs de SGI de l'échantillon, nous étions souvent 5 fois en-dessous de la concentration voulue. Il fallait donc remettre le tube dans lequel se trouvait notre solution finale à centrifuger, de façon à éliminer le surnageant dépourvu d'œufs. La coproscopie de McMaster réalisée avant les manipulations ne permettait pas d'évaluer la quantité de déchets organiques qui allait se retrouver dans le fond du tube Falcon. Nous

avons beau passer du temps à nettoyer la solution contenant les œufs, il restait parfois trop peu de liquide pour séparer les œufs des débris. Il faudrait sélectionner les élevages avec un nombre minimum d'opg, 400 opg par exemple.

Depuis mon travail, les dernières étapes ont été simplifiées et améliorées, permettant de supprimer l'étape de concentration sur gradient de saccharose, et donc de gagner du temps.

- Application pratique et améliorations

Cette étape d'extraction des œufs reste longue, environ 3h du début du lavage à l'obtention de la bonne concentration en œufs. De notre côté, pour avoir le temps de gérer la suite du protocole, comme la lecture des plaques, nous ne traitons qu'un élevage par semaine.

Si l'on imaginait appliquer ce protocole en termes de recherche de résistance dans un élevage pour adapter en direct la molécule anthelmintique à utiliser, il faudrait plusieurs manipulateurs, de façon à pouvoir traiter plusieurs échantillons en parallèle. Il faudrait qu'une même personne reste sur la même étape et enchaîne la préparation de plusieurs échantillons.

Concernant la quantité insuffisante d'œufs dans les prélèvements de fèces, nous calculions au préalable à l'aide des coproscopies la quantité de matière à utiliser une fois la quantité en opg déterminée. Même en prenant le double de la masse calculée, nous n'arrivions parfois pas au nombre satisfaisant d'œufs à la fin des étapes d'extraction. Nous savions donc que nous perdions des œufs pendant une ou plusieurs étapes, mais nous ne savions pas comment. Comme indiqué plus haut, nous avons tenté sans succès de déterminer la quantité d'œufs à la fin du tamisage. Il faudrait trouver un moyen d'évaluer ces pertes.

C. Préparation des solutions d'anthelmintiques

Les échelles de concentrations d'anthelmintiques utilisées dans notre protocole sont issues d'une synthèse de données de la littérature. Les valeurs varient beaucoup d'un article à un autre. Notre choix balaie une grande partie de ces valeurs, et est centré autour des valeurs attendues de seuil de résistance.

La dilution des anthelmintiques est communément faite dans les mêmes solvants. Dans la grande majorité des publications, les benzimidazoles et les lactones macrocycliques sont dilués dans du DMSO, le lévamisole dans de l'eau déminéralisée (Dolinská et al., 2013; Mickiewicz et al., 2019; Varady et al., 1996). L'INRAe de Tours a quant à elle décidé de diluer le thiabendazole dans du PBS, un tampon phosphate salin, et les lactones macrocycliques dans l'éthanol. Von Samson-Himmelstjerna et

al. ont comparé en 2009 l'efficacité du thiabendazole dilué dans de l'eau distillée par rapport au DMSO. Il en a résulté que la solution à base d'eau distillée n'était plus efficace au bout de 48h, l'activité ayant baissé de 60% (Demeler et al., 2010).

Nous avons plusieurs options quant à la conservation des solutions d'anthelminthiques. L'INRAe de Tours les conserve à température ambiante et à l'abri de la lumière dans des aliquots, pendant un mois maximum. Varady et al. conservaient les solutions plusieurs mois au frigo entre 4 et 6 degrés (Varady et al., 1996). La dernière option est la conservation au congélateur, plusieurs mois dans des aliquots à -20 degrés. Demeler et al. préparaient les solutions mères et les stockaient ainsi avant décongélation et dilution (Demeler et al., 2010).

Le plus simple pour nous au laboratoire a été de préparer les solutions mères dans des tubes Falcon, puis de préparer les dilutions dans des aliquots, et de congeler le tout à -20 degrés jusqu'à leur utilisation. Le lévamisole a été dilué dans de l'eau déminéralisée, et le thiabendazole et l'éprinomectine dans du DMSO, comme indiqué plus haut. La réalisation des protocoles pour les trois élevages ci-dessus ayant duré environ 1 mois, le stockage des solutions anthelminthiques n'a pas duré longtemps. Les trois solutions étaient préparées selon le même protocole. Aucun problème n'est à rapporter. La procédure de préparation était longue, car les aliquots étant petits, il a fallu en préparer un nombre conséquent. En effet, un aliquot ne servait à remplir que 2 puits.

D. Test de développement larvaire

1) Paramètres du milieu de culture

De façon à obtenir la meilleure croissance larvaire possible, il a fallu réfléchir sur tous les éléments susceptibles de ralentir leur développement, y compris pendant la phase d'extraction des œufs.

Le premier élément à évaluer était la base du test : les fèces. Pour pouvoir mettre les œufs en culture, il faut les avoir conservés correctement après leur prélèvement, de façon à en garder suffisamment et en bon état pour qu'ils puissent éclore. Pr. Chartier écrit dans son livre de pathologie caprine que les œufs peuvent être conservés une semaine au réfrigérateur entre +2°C et +6°C pour effectuer des coproscopies (Chartier, 2009). Cela est bien adapté pour les analyses coprologiques de comptage des œufs. Cependant, un article de Broussard stipule que la réfrigération pendant 24h bloque la croissance et la détérioration des œufs (Broussard, 2003). La congélation ou la conservation dans le formol sont également évoquées, mais non envisageables, car ils entraînent la mortalité des

œufs et en raison de la toxicité du formol. Nous avons opté pour la solution la plus sûre possible : l'envoi des échantillons à température ambiante et leur traitement le plus rapidement possible avec leur prélèvement.

Nous avons longuement questionné la qualité de notre milieu de culture, car nous avons un fort taux de mortalité au début, dans les puits témoins. Les larves mourraient rapidement après l'éclosion des œufs. Nous nous sommes demandé s'il n'y avait pas un problème dès la phase d'extraction des œufs. Il fallait être certains qu'il ne restait pas de NaCl dans la solution après l'étape de flottation, ni de saccharose après l'étape de flottation sur le gradient de saccharose. Les œufs étaient minutieusement rincés sur le tamis à mailles de 20 μm avec de l'eau distillée.

Le protocole d'Hubert et Kerboeuf de 1992 indiquait de n'ajouter le milieu nutritif que 24h après la mise en culture, en raison du risque d'inhibition de l'éclosion des œufs. Effectivement, nous avons de meilleurs taux d'éclosion et de croissance en ajoutant la solution de yeast/Earle à J+1 qu'en même temps que les œufs (Hubert & Kerboeuf, 1992).

En outre, nous avons tenté des mises en culture dans des plaques à 48 ou 96 puits. Malgré le film utilisé pour sceller les plaques et les rendre hermétiques, les puits s'asséchaient. La plaque de 96 puits était complètement sèche au bout de quelques jours, tandis que la plaque de 48 puits s'asséchait moins vite mais perdait tout de même trop de liquide pour que l'expérimentation ne fonctionne. Outre les problèmes liés à l'assèchement et la mortalité, une évaporation partielle modifie la concentration en anthelminthique dans les puits et donc l'interprétation des résultats. Depuis, les plaques sont scellées avec des films étanches pour éviter l'évaporation.

Nous avons remarqué une différence notable de développement des larves entre des puits de composition pourtant identique. C'était le cas par exemple des tests de l'élevage 2 pour l'éprinomectine. Les larves se développaient aussi bien dans le puit témoin que dans les puits contenant l'anthelminthique en concentration importante. Il est probable que nous ne maîtrisons pas tous les paramètres du milieu de culture, ce qui rend parfois aléatoire la croissance des L3. Il est aussi possible que le comptage des L3 soit mal réalisé au bout d'un certain temps de comptage ou que le milieu soit trop encombré par les débris végétaux pour compter correctement les L3. En outre, des erreurs de pipetage ne sont pas à exclure, ce qui génère des différences de concentrations des solutions nutritives ou d'anthelminthique dans les puits.

2) Résultats du test de développement larvaire

Notre étude a montré que les élevages étudiés étaient résistants au thiabendazole et à l'éprinomectine.

La seule molécule en partie fonctionnelle dans notre étude est le lévamisole. Cette molécule ne semble cependant plus fonctionner dans l'un des trois élevages étudiés. C'est un résultat cohérent avec la littérature. Rose Vineer et al. établissent en 2020 dans leur revue de la littérature que le taux de résistance des caprins au lévamisole est de 20% (Rose Vineer et al., 2020). Pour conclure de manière franche sur l'existence de résistance ou non, il faudrait retester la molécule. Le LDA pourrait être reproduit, afin de voir si les résultats obtenus sont reproductibles, ou un FECRT pourrait être réalisé, à titre de comparaison avec ce que l'on a déjà. Une explication possible de ce faible taux de résistance par rapport aux autres familles de molécules est que le lévamisole est une molécule interdite d'utilisation chez les femelles laitières. Elle est donc beaucoup moins utilisée et les parasites ont donc peu été exposés à cette molécule.

Nous voyons cependant que dans nos expérimentations, la résistance à l'éprinomectine est observée dans tous les élevages testés, selon la dose discriminante choisie vis-à-vis des résultats dans la littérature. C'est la molécule la plus récente parmi celles que nous testons. Son emploi doit être extrêmement précautionneux, une telle molécule, efficace sur la plupart des parasites et autorisée dans la filière lait sans temps d'attente, risque fort de devenir rapidement inutilisable dans beaucoup d'élevages si les animaux sont traités sans précautions. C'est déjà le cas dans l'étude du projet ParCap Aura lorsque cette molécule est administrée par voie topique (Devos et al., 2022). Seuls 23% des élevages testés ont un test de réduction d'excrétion fécale supérieur à 95%. En 2020, Bordes et al. montrent dans les Pyrénées-Atlantiques par des tests de réduction d'excrétion fécale que l'éprinomectine injectable et administrée *per os* ne fonctionnent plus, pour respectivement 21,5% et 16,7% des élevages testés (Bordes et al., 2020). Au niveau européen, la revue de la littérature de Rose Vineer montre que la résistance aux lactones macrocycliques est présente dans 44% des élevages de caprins testés (Rose Vineer et al., 2020).

Pour ce qui est du thiabendazole, les parasites présentent une résistance dans les trois élevages testés. Il s'agit d'une molécule appartenant à la plus ancienne famille d'anthelminthique sur le marché, largement utilisée pendant de nombreuses années. Des études montrent que la plupart des élevages de petits ruminants sont résistants aux benzimidazoles (Bordes et al., 2020; Geurden et al., 2014). Le test de réduction d'excrétion fécale dans l'étude de Bordes et al., réalisé dans les Pyrénées-

Atlantiques sur un élevage est de 0 % (Bordes et al., 2020). La review de Rose Vineer et al. n'évoque qu'un taux de résistance de 51 % aux benzimidazoles (Rose Vineer et al., 2020). Cependant, il est difficile de comparer notre étude comprenant 3 élevages avec une revue synthétisant des données de dizaines d'études. Cette ébauche de test doit être améliorée pour étudier la résistance sur davantage d'élevages.

Pour un des 3 élevages rentrés dans l'étude (élevage 2), des tests de réduction d'excrétion fécale ont été réalisés. Ces tests *in vivo*, considérés comme les tests de référence pour évaluer les résistances (Kaplan et al., 2023), ont montré que le fenbendazole présente entre 87% et 94% d'efficacité (sans et avec correction liée au lot témoin, respectivement), et l'éprinomectine entre 99 et 100% d'efficacité. On considère un anthelminthique efficace lorsque le test de réduction d'excrétion fécale donne une valeur supérieure à 95% (Chauvin et al., 2015b). Le fenbendazole ne fonctionne plus sur les parasites de l'élevage concerné comme nous avons pu le montrer avec le test *in vitro*, alors que l'éprinomectine est encore efficace. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses sur cette grande différence de résultats entre le FECRT et le LDA de l'éprinomectine. Des erreurs de manipulations ne sont pas à exclure dans la réalisation de notre LDA. Le milieu de culture n'est peut-être pas encore adapté, ce qui signifierait que la résistance constatée via ce LDA est surestimée. D'autre part, l'exposition des parasites à l'anthelminthique n'est pas la même dans les deux tests. Dans le FECRT, les parasites sont exposés à l'anthelminthique via le métabolisme de l'animal, alors que pour le LDA, la molécule est directement mise en contact des œufs et des larves dans le puit. Cette différence d'exposition pourrait expliquer les différences de résultats, justement si l'exposition des larves aux anthelminthiques n'est pas optimale. Soit les larves ne sont pas dans le milieu de développement qui leur convient, soit l'anthelminthique n'est pas apporté de façon appropriée. Enfin, nous avons choisi une valeur de dose discriminante arbitraire de 12,5 ng/mL sur la base d'une seule étude (Dolinská et al., 2013). D'autres études comparant des souches sensibles et résistantes avec des tests LDA et en comparant avec des tests *in vivo* (FECRT) permettraient de valider ce test pour l'éprinomectine et une valeur de dose discriminante.

3) Interprétation

Au préalable, nous souhaitons interpréter les développements relatifs des larves en calculant les DL50, doses létales 50, c'est-à-dire les concentrations d'anthelminthiques pour lesquelles le développement des larves 3 est de 50%. Cependant, en traçant le développement relatif des L3 en fonction du logarithme décimal de la concentration, nous n'obtenons pas la courbe sigmoïde voulue.

Il aurait fallu travailler avec un plus grand spectre de concentrations pour avoir un beau décrochement entre les valeurs basses et les valeurs hautes.

Des auteurs n'utilisent que la valeur des doses discriminantes pour l'interprétation des résultats. Selon certaines études, l'utilisation de la DL50 dans l'interprétation des résultats sous-estime la présence de résistances. L'emploi de la dose discriminante permet d'identifier des résistances lorsque peu de parasites ne sont plus sensibles à l'anthelminthique (Varady et al., 2007).

4) Pistes d'améliorations à apporter au test

Le test n'est pour le moment pas suffisamment efficace ni qualitatif. Les données présentées sont le résultat de beaucoup d'essais, c'est pourquoi il reste une marge de progression.

Dans beaucoup des essais, le nombre de L3 parvenant au terme de leur croissance ne dépassait pas 50% dans les puits témoins. Les élevages pour lesquels cela était le cas n'ont pas été retenus dans les résultats. Dans les publications sur lesquelles nous nous sommes basés pour établir ce protocole, le pourcentage de développement des L3 peut dépasser 80% dans les puits témoins (Demeler et al., 2010; Hubert & Kerboeuf, 1984, 1992). C'est l'objectif à atteindre lors de la réalisation de tels tests. Le test utilisé ici est une version améliorée de celui utilisé pour une première série de tests (Mongellaz Clément, 2019), dans laquelle l'auteur évoquait la possibilité d'ajouter une suspension d'*E. coli* lyophilisées pour améliorer la croissance des L3. Le développement maximal est passé de 30% dans cette première série à des valeurs hétérogènes ici. Les résultats sont meilleurs, mais des études restent nécessaires pour améliorer le test et comprendre ces écarts, comme discuté précédemment. Un nouveau protocole a depuis été testé par l'INRAE sur la base de cultures de bactéries et d'extrait de fèces qui semble donner de meilleurs résultats, mais qui est plus long à mettre en place.

La différence de développement entre les puits est un point négatif notable. Dans deux puits identiques, c'est-à-dire pour une concentration d'une molécule donnée pour un élevage donné, le développement des larves pouvait être radicalement différent. Les larves pouvaient aussi ne pas se développer dans un puit témoin, et bien dans un puit contenant un anthelminthique. Nous avons également eu le cas de larves qui se développaient mieux dans un puit à plus forte concentration d'anthelminthique qu'un autre. Ces faits aberrants pourraient s'expliquer par la difficulté de la mise en culture, avec de possibles erreurs de pipetage, et des erreurs d'identification et de comptage des larves de stade 3. La différence entre une L2 et une L3 n'est pas toujours évidente, il peut arriver de compter des L3 qui sont en fait des L2. En outre, à la fin de la période d'incubation, certaines larves sont en mauvais état, lysées, et difficilement identifiables. A cela s'ajoutent les débris végétaux qui

compliquent la lecture et sont susceptibles de recouvrir des Larves ou des oeufs. Pour conclure sur cette partie, la qualité du puit en fin d'incubation, et le jugement de l'expérimentateur sur ce qu'il observe peuvent beaucoup influencer les résultats.

Enfin, pour ne pas se retrouver pressé dans la lecture des plaques parce qu'il y en a beaucoup à lire, rapidement pour éviter la détérioration des larves, il est possible à l'avenir d'envisager de prendre les puits en photo au microscope. Pour les plaques de 24 puits sur lesquelles nous travaillions, cela aurait constitué un travail fastidieux car les puits sont de très grand diamètre. Cette technique serait envisageable pour de plaques de 96 puits. Les photos pourraient ensuite être traitées de façon numérique. Cependant, ce processus ne permet pas de faire varier la mise au point, moyen indispensable pour distinguer les L2 des L3.

E. Conséquences de cette étude sur les habitudes

Cette étude soulève des problématiques méconnues des éleveurs. Le fait de rentrer leur élevage dans l'étude et de montrer, par exemple, que le thiabendazole n'est plus utilisable chez eux les fait réfléchir ainsi que leurs vétérinaires. Ce type d'étude sert à remettre en question les habitudes de médicalisation du troupeau. Les éleveurs réfléchissent en premier lieu vis-à-vis du coût, les benzimidazoles étant les molécules les moins chères. C'est aussi un automatisme à revoir en voyant les résultats de l'étude. Il est également préféré aujourd'hui limiter le nombre de médicaments administrés aux animaux de rente, cela passe par l'économie d'antiparasitaires.

De plus, la coproscopie réalisée avant l'extraction des œufs nous indique le niveau d'infestation des animaux, et la nécessité ou non de traiter. Parmi tous les élevages échantillonnés, de nombreux élevages avaient des niveaux d'excrétion faibles, et notamment plus faibles que ceux attendus par les éleveurs et leurs vétérinaires. Ces résultats montrent bien l'importance de faire des coproscopies avant de décider de traiter.

F. Perspectives de l'étude

Nous avons des doses discriminantes pour le thiabendazole et le lévamisole dans la littérature, mais les données manquent pour l'éprinomectine. Il est nécessaire de revoir les seuils pour cette molécule, en faisant des tests avec des souches sensibles et résistantes (Dolinská et al., 2013).

Il est compliqué d'imaginer implanter ces types de tests en clientèle rurale. Le matériel nécessaire prend de la place et le test requiert beaucoup de temps et une expertise. Le coût d'une telle analyse réalisée par un laboratoire spécialisé serait prohibitif pour les éleveurs, aux vues de leur situation

financière souvent délicate. C'est pourquoi ce type d'analyse ne peut être réalisé que dans le cadre de travaux de recherche pour le moment. Une manière de démocratiser la mise en culture serait d'utiliser la dose discriminante comme seuil de référence, pour réduire considérablement le temps et les coûts d'un tel test.

L'analyse à ajouter au LDA est l'identification des espèces résistantes de parasites. En effet, Dolinská et al. évoquent une plus grande résistance des genres *Ostertagia* et *Trichostrongylus* aux avermectines utilisées dans leurs tests (Dolinská et al., 2013). Il serait intéressant de constater si les anthelmintiques utilisés ont sélectionné des espèces en particulier, et s'il s'agit des espèces les plus pathogènes ou non.

CONCLUSION

Les strongyloses digestives des petits ruminants et leur maîtrise sont des problématiques sanitaire et économique majeures. Afin de limiter ces impacts, différentes mesures de gestion du parasitisme peuvent être mises en place, dont des pratiques agronomiques et l'emploi d'anthelmintiques. Cependant, l'usage répété des anthelmintiques a favorisé le développement de souches de parasites résistantes aux traitements. Le développement de résistances laisse bon nombre d'éleveurs et de vétérinaires au dépourvu, sans molécule pour assainir leurs troupeaux de parasites.

Les connaissances sur la présence de résistances dans les élevages caprins restent faibles et parcellaires. Pour une meilleure connaissance de la situation et afin de détecter précocement les résistances, il faudrait pouvoir mettre en place des suivis des résistances dans les élevages. Mais les méthodes d'évaluation des résistances aux antiparasitaires sont souvent longues, complexes et coûteuses.

Notre étude expérimentale visait à utiliser un test *in vitro* pour évaluer la résistance de strongles digestifs de caprins au lévamisole, au thiabendazole et à l'éprinomectine. Nous sommes partis d'un protocole de test de développement larvaire que nous avons revu. Sur les 3 élevages testés, nous avons pu observer à la fois une résistance au thiabendazole et à l'éprinomectine dans les 3 élevages, mais seulement dans un élevage pour le lévamisole. Ces résultats sont cohérents avec ce que l'on peut trouver dans la littérature. Concernant l'éprinomectine, nous sommes bien au-delà du seuil de valeur discriminante proposé ici, mais la validité du test pour cette molécule reste à confirmer.

Il est important de continuer à mener ce genre de recherches pour d'une part surveiller la progression de la résistance, et d'autre part, montrer aux éleveurs que les traitements chimiques ne peuvent être l'unique solution au parasitisme. Notre étude montre que sur un petit nombre d'élevages, deux molécules sur les trois essayées ne fonctionnent plus. En réalisant ce test à plus large échelle, nous pourrions sûrement nous rendre compte que la plupart des élevages se trouvent dans ce cas, comme cela a été montré dans d'autres pays, notamment au niveau Européen. Cela permet également de montrer aux éleveurs la situation de leur troupeau, et d'ouvrir sur d'autres solutions. Le développement et la mise en pratique de stratégies d'utilisation raisonnée des anthelmintiques afin de préserver leur efficacité ainsi que l'utilisation de solutions alternatives, sont indispensables pour continuer à élever des caprins au pâturage.

BIBLIOGRAPHIE

- Amarante, A. F. T., Pomroy, W. E., Charleston, W. A. G., & al. (1997). Evaluation of a larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology*, 27, 305-311.
[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)00183-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00183-X)
- ANSES. (2021). *RCP Eprecis solution injectable*. European Medicines Agency.
<http://www.ircp.anmv.anses.fr/rcp.aspx?NomMedicament=EPRECIS+20+MG%2fML+SOLUTION+INJECTABLE+POUR+BOVINS%2c+OVINS+ET+CAPRINS>
[consulté le 16 juin 2023]
- Avramenko, R. W., Redman, E. M., Lewis, R., Bichuette, M. A., Palmeira, B. M., Yazwinski, T. A., & Gilleard, J. S. (2017). The use of nemabiome metabarcoding to explore gastro-intestinal nematode species diversity and anthelmintic treatment effectiveness in beef calves. *International Journal for Parasitology*, 47(13), 893-902.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.06.006>
- Avramenko, R. W., Redman, E. M., Lewis, R., Yazwinski, T. A., Wasmuth, J. D., & Gilleard, J. S. (2015). Exploring the Gastrointestinal « Nemabiome » : Deep Amplicon Sequencing to Quantify the Species Composition of Parasitic Nematode Communities. *PloS One*, 10(12), e0143559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143559>
- Avramenko, R. W., Redman, E. M., Melville, L., Bartley, Y., Wit, J., Queiroz, C., Bartley, D. J., & Gilleard, J. S. (2019). Deep amplicon sequencing as a powerful new tool to screen for sequence polymorphisms associated with anthelmintic resistance in parasitic nematode populations. *International Journal for Parasitology*, 49(1), 13-26.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.10.005>

- Bertocchi, M. (2019). *Résistances des strongles digestifs aux benzimidazoles chez les bovins laitiers du Grand Ouest* [Oniris Nantes]. <https://doc-veto.oniris-nantes.fr/ListRecordVisio.htm?idlist=13&record=19310625124911388079>
- Bordes, L., Dumont, N., Lespine, A., & al. (2020). First report of multiple resistance to eprinomectin and benzimidazole in *Haemonchus contortus* on a dairy goat farm in France. *Parasitology International*, 76, 102063. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102063>
- Bousquet-Mélou, A., Jacquiet, P., Hoste, H., Clément, J., Bergeaud, J.-P., Alvinerie, M., & Toutain, P.-L. (2011). Licking behaviour induces partial anthelmintic efficacy of ivermectin pour-on formulation in untreated cattle. *International Journal for Parasitology*, 41(5), 563-569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.12.007>
- Broussard, J. D. (2003). *Optimal Fecal Assessment*. 13.
- Busin, V., Kenyon, F., Parkin, T., McBean, D., Laing, N., Sargison, N. D., & Ellis, K. (2014). Production impact of a targeted selective treatment system based on liveweight gain in a commercial flock. *The Veterinary Journal*, 200(2), 248-252. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.012>
- Charlier, J., Bartley, D. J., Sotiraki, S., Martinez-Valladares, M., Claerebout, E., von Samson-Himmelstjerna, G., Thamsborg, S. M., Hoste, H., Morgan, E. R., & Rinaldi, L. (2022). Chapter Three - Anthelmintic resistance in ruminants : Challenges and solutions. In D. Rollinson & R. Stothard (Éds.), *Advances in Parasitology* (Vol. 115, p. 171-227). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2021.12.002>
- Chartier, C. (2009). *Pathologie caprine : Du diagnostic à la prévention* (Editions du point vétérinaire, Vol. 162). Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France.

- Chartier, C., & Hoste, H. (1996). Impact des strongyloses gastro-intestinales sur la physiologie digestive et sur la production laitière chez les Caprins. *Bulletin des GTV*, 3, 85-93.
- Chartier, C., Soubirac, F., Pors, I., Silvestre, A., Hubert, J., Couquet, C., & Cabaret, J. (2001). Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *Journal of Helminthology*, 75(4), 325-330. <https://doi.org/10.1017/S0022149X01000506>
- Chauvin, A., Ravinet, N., & Chartier, C. (2015a). La résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques chez les bovins. *Le nouveau praticien vétérinaire, élevage et santé*, 8(30), 23-31.
- Chauvin, A., Ravinet, N., & Chartier, C. (2015b). La résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques chez les bovins. *Nouveau Praticien Vétérinaire Elevage Santé*, 8(30), 23-31.
- Chauvin, A., Ravinet, N., & Chartier, C. (2015c). Le contrôle des helminthoses de pâture chez les bovins. *Le nouveau praticien vétérinaire, élevage et santé*, 8(30).
- Cheah, T. S., & Rajamanickam, C. (1997). Epidemiology of gastro-intestinal nematodes of sheep in wet tropical conditions in Malaysia. *Tropical Animal Health Production*, 29(3), 165-173. <https://doi.org/10.1007/bf02633015>
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., & al. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1-2), 35-44. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)

- Cornelius, M. P., Jacobson, C., & Besier, R. B. (2009). Body score as a selection tool for targeted selective treatment-based nematode control strategies in Merinos ewes. *Veterinary Parasitology*, *164*(1), 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.031>
- Couasnon, F., Fresnay, E., Paraud, C., & Bridoux, N. (2019). Action, efficacité et résistance à l'éprinomectine chez les petits ruminants. *Le point vétérinaire Rural*, *398*, 52.
- Craig, N. M., Miller, H. R. P., & Smith, W. D. (2007). Cytokine expression in naïve and previously infected lambs after challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *120*(1-2), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.07.004>
- Demeler, J., Küttler, U., & Von Samson-Himmelstjerna, G. (2010). Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastrointestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*, *170*, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.032>
- Deplazes, P., Eckert, J., Mathis, A., & al. (2016). *Parasitology in veterinary medicine* (1ère). Édition Wageningen Academic Publishers. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-274-0>
- Devos, J., Bourgoïn, G., Heckendorn, F., & Hoste, H. (2022). *Projet ParCap AuRA: quels enseignements pour les vétérinaires praticiens ?* [Oral Presentation]. Journée des GTV Rhône-Alpes, 29/09/2022, Lyon, France.
- Dobson, R., Barnes, E., Tyrrell, K., Hosking, B., Larsen, J., Besier, R., Love, S., Rolfe, P., & Bailey, J. (2011). A multi-species model to assess the effect of refugia on worm control and anthelmintic resistance in sheep grazing systems. *Australian Veterinary Journal*, *89*(6), 200-208. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00719.x>

- Dolinská, M., Königová, A., Letková, V., Molnár, L., & Várady, M. (2013). Detection of ivermectin resistance by a larval development test—Back to the past or a step forward? *Veterinary Parasitology*, *198*(1-2), 154-158.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.043>
- Doyle, S. R., Illingworth, C. J. R., Laing, R., Bartley, D. J., Redman, E., Martinelli, A., Holroyd, N., Morrison, A. A., Rezansoff, A., Tracey, A., Devaney, E., Berriman, M., Sargison, N., Cotton, J. A., & Gilleard, J. S. (2019). Population genomic and evolutionary modelling analyses reveal a single major QTL for ivermectin drug resistance in the pathogenic nematode, *Haemonchus contortus*. *BMC Genomics*, *20*(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5592-6>
- Dravigney, L., Ravinet, N., Jozan, T., Grelaud, P., Ledieu, L., Lopez, M., & Christophe, C. (2022). Emergence de résistance aux anthelminthiques dans des élevages de bovins du Haut Cantal. *Bulletin des GTV*, *106*, 47-54.
- Drudge, J. H., Szanto, J., Wyant, Z. N., & Elam, G. (1964). Field studies on parasite control in sheep : Comparison of thia-bendazole, ruelene, and phenothiazine. *American Journal of Veterinary Research*, *25*(108), 1512-1518.
- Dwight, D., & Bowman, M. S. (2014). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (Elsevier, Vol. 10th).
- EMA. (2014, novembre 7). *RCP Zolvix*. Index des RCP [en ligne].
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zolvix-epar-product-information_fr.pdf [consulté le 16 juin 2023]
- Falzon, L. C., O'Neill, T. J., Menzies, P. I., Peregrine, A. S., Jones-Bitton, A., vanLeeuwen, J., & Mederos, A. (2014). A systematic review and meta-analysis of factors associated

- with anthelmintic resistance in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(2), 388-402. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.07.003>
- George, M. M., Adriano, F. V., Sue, B. H., & al. (2021). Evaluation of changes in drug susceptibility and population genetic structure in *Haemonchus contortus* following worm replacement as a means to reverse the impact of multiple-anthelmintic resistance on a sheep farm. *International Journal for Parasitology*, 15, 134-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.02.004>
- George, M. M., Paras, K. L., Howell, S. B., & al. (2017). Utilization of composite fecal samples for detection of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*, 240, 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.02>
- Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., di Regalbono, A. F., Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Vanimisetti, H. B., Bartram, D. J., & Denwood, M. J. (2015). Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.08.001>
- Geurden, T., Hoste, H., Jacquet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., Frangipane di Regalbono, A., Tzanidakis, N., Kostopoulou, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., Noé, L., Vanimisetti, B., & Bartram, D. (2014). Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology*, 201(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.016>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pdb.prot095182. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>

- Gruner, L., Aumont, G., Getachew, T., Brunel, J. C., Pery, C., Cognié, Y., & Guérin, Y. (2003). Experimental infection of Black Belly and INRA 401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. *Veterinary Parasitology*, *116*(3), 239-249. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.07.005>
- Gruner, L., Bouix, J., & Brunel, J. C. (2004). High genetic correlation between resistance to *Haemonchus contortus* and to *Trichostrongylus colubriformis* in INRA 401 sheep. *Veterinary Parasitology*, *119*(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.014>
- Healey, K., Lawlor, C., Knox, M. R., Chambers, M., & Lamb, J. (2018). Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals : Tracer studies in sheep. *Veterinary Parasitology*, *253*, 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.010>
- Hodgkinson, J. E., Clark, H. J., & Kaplan, R. M. (2008). The role of polymorphisms at β tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *International Journal for Parasitology*, *38*(10), 1149-1160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.02.001>.
- Hoste, H., Chartier, C., & Lefrileux, Y. (2002). Control of gastrointestinal parasitism with nematodes in dairy goats by treating the host category at risk. *Vet Research*, *33*(5), 531-545. <https://doi.org/10.1051/vetres:2002037>
- Hoste, H., Rulie, A. C., & Prevot, F. (2006). Differences in receptivity to gastrointestinal infections with nematodes in dairy ewes : Influence of age and of the level of milk production. *Vet Research*, *63*(1-2), 150-155.
- Hubert, J., & Kerboeuf, D. (1984). A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis : Comparison with fecal cultures. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, *48*(1), 63-71.

- Hubert, J., & Kerboeuf, D. (1992). A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, 20(130), 442-446.
<https://doi.org/10.1136/vr.130.20.442>
- Ijaz, M., Khan, S. M., Avais, M., Ashraf, K., Ali, M. M., & Kahn, M. Z. U. (2009). Infection rate and chemotherapy of various helminthes in diarrhoeic sheep in and around Lahore. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 19(1), 13-16.
- Inman, C., & Hudson, C. (2011). Cattle immunology : The immune response to parasites. *Point Vétérinaire Italie s.r.l.*, 6(2), 22-26.
- Institut de l'élevage. (s. d.). Idele [en ligne]. Consulté 16 juin 2023, à l'adresse
<https://idele.fr/en/parasitsim>
- Jacquet, P., Barillet, F., Bouix, J., Francois, D., Moreno-Romieux, C., & Terefe, G. (2009). La résistance génétique des ovins aux strongles gastro-intestinaux. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 162(1), 39-46. <https://doi.org/10.4267/2042/47974>
- Kaplan, R. M., Denwood, M. J., Nielsen, M. K., Thamsborg, S. M., Torgerson, P. R., Gilleard, J. S., Dobson, R. J., Vercruyse, J., & Levecke, B. (2023). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. *Veterinary Parasitology*, 318, 109936.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109936>
- Königová, A., Urda Dolinská, M., Babják, M., von Samson-Himmelstjerna, G., Komáromyová, M., & Várady, M. (2021). Experimental evidence for the lack of sensitivity of in vivo faecal egg count reduction testing for the detection of early development of benzimidazole resistance. *Parasitology Research*, 120(1), 153-159.
<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06965-0>

- Kotze, A. C., Le Jambre, L. F., & O'Grady, J. (2006). A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. *Veterinary Parasitology*, 137(3-4), 294-305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.017>
- Lacroux, C., Nguyen, T. H. C., Andreoletti, O., Prevot, F., Grisez, C., Bergeaud, J.-P., Gruner, L., Brunel, J.-C., Francois, D., Dorchies, P., & Jacquet, P. (2006). *Haemonchus contortus* (Nematoda : Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Veterinary Research*, 37(4), 607-622. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006022>
- Le Mer, J. M. (2017). Gestion de l'apparition des résistances aux anthelminthiques chez les ruminants. *JNGTV Reims*, 517-521.
- Learmount, J., Gettinby, G., Boughtflower, V., Stephens, N., Hartley, K., Allanson, P., Gutierrez, A. B., Perez, D., & Taylor, M. (2015). Evaluation of 'best practice' (SCOPS) guidelines for nematode control on commercial sheep farms in England and Wales. *Veterinary Parasitology*, 207(3), 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.004>
- Little, P., Hodge, A., Watson, T., Seed, J., & Maeder, S. (2010). Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel-abamectin, in sheep in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 58(3), 121-129. <https://doi.org/10.1080/00480169.2010.67513>
- Lloberas, M., Alvarez, L., Entrocasso, C., Virkel, G., Lanusse, C., & Lifschitz, A. (2012). Measurement of ivermectin concentrations in target worms and host gastrointestinal tissues : Influence of the route of administration on the activity against resistant

- Haemonchus contortus* in lambs. *Experimental Parasitology*, 131(3), 304-309.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.014>
- Mickiewicz, M., Czopowicz, M., Kawecka-Grochocka, E., & al. (2020). The first report of multidrug resistance in gastrointestinal nematodes in goat population in Poland. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02501-5>
- Mickiewicz, M., Czopowicz, M., Kawecka-Grochocka, E., Moroz, A., Szaluś-Jordanow, O., Várady, M., Königová, A., Spinu, M., Górski, P., Bagnicka, E., & Kaba, J. (2020). The first report of multidrug resistance in gastrointestinal nematodes in goat population in Poland. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 270.
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02501-5>
- Mickiewicz, M., Czopowicz, M., Moroz, A., & al. (2019). Development of resistance to eprinomectin in gastrointestinal nematodes in a goat herd with pre-existing resistance to benzimidazoles. *Polish Journal of Veterinary science*, 22(4), 753-760.
<https://doi.org/10.24425/pjvs.2019.131404>
- Mongellaz Clément. (2019). *Evaluation in vitro de la résistance aux anthelminthiques des strongles gastro-intestinaux des ruminants* (Thèse de doctorat vétérinaire).
- Noble, E. R. (1964). Parasitology : The biology of animal parasites. Philadelphia : Lea & Febiger, 201-327.
- O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., & Kahn, L. P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, 142(1-2), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.035>
- Paraud, C., Chartier, C., & Devos, J. (2013). Cas d'inefficacité de l'éprinomectine pour-on dans un élevage caprin. *Bulletin des GTV*, 97-103.

- Paraud, C., Pors, I., Marcotty, T., & Devos, J. (2014). Un premier cas de résistance aux lactones macrocycliques chez les nématodes gastro-intestinaux confirmé en élevage ovin en France. *Rencontres recherche ruminants*, 21, 325-328.
- Peña-Espinoza, M., Valente, A. H., Bornancin, L., Simonsen, H. T., Thamsborg, S. M., Williams, A. R., & López-Muñoz, R. (2020). Anthelmintic and metabolomic analyses of chicory (*Cichorium intybus*) identify an industrial by-product with potent in vitro antinematodal activity. *Veterinary Parasitology*, 280, 109088.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109088>
- Rialch, A., Vatsya, S., & Kumar, R. R. (2013). Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats of sub-Himalayan region of northern India using different tests. *Veterinary Parasitology*, 198(3-4), 312-318.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.018>
- Richelme, A. (2019). *Évaluation de la résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques dans sept élevages ovins allaitants du Limousin* [Thèse d'exercice]. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.
- Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Next-generation molecular-diagnostic tools for gastrointestinal nematodes of livestock, with an emphasis on small ruminants : A turning point? *Adv. Parasitol.*, 83, 267-333. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407705-8.00004-5>
- Romero, C. G., & Gruner, L. (1984). Influence de la température et de l'humidité sur l'infestation par des strongles gastro-intestinaux de prairies fréquentées par des bovins. *Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions*, 15(1), 65-74.

- Rose Vineer, H., Morgan, E. R., Hertzberg, H., & al. (2020). Increasing importance of anthelmintic resistance in European live stock : Creation and meta-analysis of an open database. *Parasite* 27, 69.
- Silvestre, A., Sauve, C., & Cabaret, J. (2007). L'éprinomectine chez la chèvre : Utilisation de la voie orale pour une efficacité reproductible contre les strongles gastro-intestinaux. *Rencontres autour des Recherches chez les Ruminants*, 14, 4.
- Smout, M. J., Kotze, A. C., McCarthy, J. S., & Loukas, A. (2010). A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), e885.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000885>
- Soulsby, E. J. L. (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals* (Williams and Wilkins, Vol. 7).
- Stafford, K., & Coles, G. C. (1999). Nematode control practices and anthelmintic resistance in dairy calves in the south west of England. *Vet Rec*, 144(24), 659-661.
<https://doi.org/10.1136/vr.144.24.659>
- Sutherland, I. A., & Leathwick, D. M. (2011). Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle : A global issue? *Trends in Parasitology*, 27(4), 176-181.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.11.008>
- Syndicat de l'industrie du médicament et diagnostic vétérinaires. (s. d.). *Med'Vet*. Consulté 23 février 2022, à l'adresse <https://www.med-vet.fr/>
- Van dem Brom, R., Moll, L., Borgstedee, F. H. M., Van Doorn, D. C., Lievaart-Peterson, K., Dercksen, D. P., & Vellema, P. (2013). Multiple anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus*, including a case of moxidectin resistance, in a Dutch sheep flock. *The Veterinary Record*, 173(22), 552. <https://doi.org/10.1136/vr.101700>

- Varady, M., Bjorn, H., & Nansen, P. (1996). In vitro Characterization of Anthelmintic susceptibility of field isolates of the pig nodular worm oesophagostomum spp., susceptible or resistant to various anthelmintics. *International Journal for Parasitology*, 26(7), 733-740.
- Varady, M., Cudekova, P., & Corba, J. (2007). In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* : Egg hatch test versus larval development test. *Vet. Parasitol.*, 149, 104-110.
- Vercruysse, J., & Claerebout, E. (2001). Treatment vs non-treatment of helminth infections in cattle : Defining the threshold. *Veterinary Parasitology*, 98(2), 195-214.
[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00431-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00431-9)
- Woolaston, R. R., & Piper, L. R. (1996). Selection of Merino sheep for resistance to *Haemonchus contortus* : Genetic variation. *Animal Science*, 62(3), 451-460.
<https://doi.org/10.1017/S1357729800014995>
- Zajac, A. M., & Conboy, G. A. (2012). *Veterinary Clinical Parasitology* (Wiley-Blackwell).

ANNEXES

ANNEXE 1 : Méthodologie de la dilution de la solution d'ivermectine

Masse molaire : 875,1 g.mol⁻¹

Solution mère : 10⁻² M dans 100% de DMSO ⇒ C = 0.01 mol.L⁻¹ ⇒ C_m = 0.01*875.1 = 8.75 g.L⁻¹ = 8.75 mg.mL⁻¹.

Nous possédions au laboratoire un pot de 250 mg d'ivermectine en poudre.

Réalisation d'une première solution A (5 mL), en diluant 50 mg d'IVM dans 5 mL de DMSO ⇒ C = 10 mg.mL⁻¹.

Réalisation d'une autre solution B (10 mL), en diluant 100 µL de la solution A dans 9.9 mL de DMSO ⇒ C = 100 µg.mL⁻¹.

N° tube	Sol B (µL)	DMSO (µL)	IVM dans sol de travail (µg.mL ⁻¹)	IVM en post-dilution 1 :15 (µg.mL ⁻¹)	IVM dans puits (µg.mL ⁻¹)
1	4	1996	0.2	0.01	0.001
2	7	1993	0.3	0.02	0.002
3	13	1987	0.6	0.04	0.004
4	25	1975	1.2	0.08	0.008
5	49	1951	2.5	0.16	0.016
6	98	1902	4.9	0.32	0.32
7	195	1805	9.8	0.65	0.065
8	390	1610	19.5	1.3	0.13
9	780	1220	39	2.6	0.26
10	1560	440	78	5.2	0.52

Les concentrations de la quatrième colonne sont obtenues via la formule : $Cf = \frac{CB*VB}{Vf}$

Avec CB la concentration de la solution mère B, VB le volume utilisé, et Vf le volume de la solution fille.

Les solutions de travail sont préparées à une concentration 150 fois supérieure à celle du puit, dans des aliquots de 2 mL.

Ces aliquots sont ensuite dilués au 15^e par ajout de PBS pour avoir 6% de DMSO à 6% et des concentrations en IVM 10 fois supérieures à celle des puits. On mélange donc 2 µL de solution de travail et 28 µL de PBS. Pour 2 puits à une concentration donnée, on fabrique 1 aliquots, soit des aliquots de 90 µL, correspondant à 2*30 µL + 30 µL supplémentaires au cas où.

Dans les puits, on ajoute 30 µL de cette solution, pour un volume total de 300 µL, d'où une dilution par 10 de la concentration.

ANNEXE 2 : Méthodologie de la dilution de la solution de thiabendazole

Réalisation d'une première solution A (5 mL), en diluant 50 mg de TBZ dans 10 mL de DMSO $\Rightarrow C = 10 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Réalisation d'une autre solution B (10 mL), en diluant 500 μL de la solution A dans 9.5 mL de DMSO $\Rightarrow C = 500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

N° tube	Sol B (μL)	DMSO (μL)	TBZ dans sol de travail ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	TBZ en post-dilution 1 :15 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	TBZ dans puits ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	3	1997	0.75	0.05	0.005
2	6	1994	1.5	0.1	0.01
3	12	1988	3	0.2	0.02
4	24	1976	6	0.4	0.04
5	48	1952	12	0.8	0.08
6	96	1904	24	1.6	0.16
7	192	1808	48	3.2	0.32
8	384	1616	96	6.4	0.64
9	769	1231	192	12.8	1.28
10	1538	462	384	25.6	2.56

Les solutions de travail sont préparées à une concentration 150 fois supérieure à celle du puit, dans des aliquots de 2 mL.

Ces aliquots sont ensuite dilués au 15^e par ajout de PBS pour avoir 6% de DMSO à 6% et des concentrations en IVM 10 fois supérieures à celle des puits. On mélange donc 2 μL de solution de travail et 28 μL de PBS. Pour 2 puits à une concentration donnée, on fabrique 1 aliquots, soit des aliquots de 90 μL , correspondant à 2*30 μL + 30 μL supplémentaires au cas où.

Dans les puits, on ajoute 30 μL de cette solution, pour un volume total de 300 μL , d'où une dilution par 10 de la concentration.

ANNEXE 3 : Méthodologie de la dilution de la solution de lévamisole

Nous possédions au laboratoire un pot de 5 g de lévamisole en poudre.

Réalisation d'une première solution A (5 mL), en diluant 40 mg d'IVM dans 40 mL d'eau $\Rightarrow C = 2$ mg.mL⁻¹.

Réalisation d'une autre solution B (10 mL), en diluant 200 μ L de la solution A dans 9.8 mL d'eau $\Rightarrow C = 40$ μ g.mL⁻¹.

N° tube	Sol B (μ L)	Eau (μ L)	LEV dans sol de travail (μ g.mL ⁻¹)	LEV dans puits (μ g.mL ⁻¹)
1	4	1996	0.3	0.03
2	8	1992	0.6	0.06
3	16	1984	1.2	0.12
4	32	1968	2.5	0.25
5	64	1936	5	0.5
6	125	1875	10	1
7	250	1750	20	2

Les solutions de travail sont préparées à une concentration 10 fois supérieure à celle du puit, dans des aliquots de 2 mL.

Pour 2 puits à une concentration donnée, on fabrique 1 aliquots, soit des aliquots de 90 μ L, correspondant à 2*30 μ L + 30 μ L supplémentaires au cas où.

Dans les puits, on ajoute 30 μ L de cette solution, pour un volume total de 300 μ L, d'où une dilution par 10 de la concentration.

ANNEXE 4 : Préparation des solutions de Earle, Escherichia Coli et d'amphotéricine

Milieu de Earle :

- Peser 1 g d'extrait de levure dans un bécher de 250 mL
- Ajouter 90 mL d'eau déionisée à l'aide d'une éprouvette de 100 mL
- Compléter avec 10 mL de solution saline de Earle à l'aide d'une pipette P5000
- Homogénéiser avec une agitation magnétique
- Répartir 5 mL dans des tubes en verre « Pyrex » à l'aide d'une pipette P5000
- Faire stériliser les tubes 15 mn à 121 °C à l'autoclave
- Conserver au froid à +4 °C.
- Au moment de l'emploi, ajuster le pH avec le bicarbonate de sodium à 7% (50µL/50µL)

Suspension d'Escherichia Coli :

- Suspension mère de concentration 1.5 mg.mL⁻¹
 - 200 mg de lyophilisat d'E. Coli sont introduits dans 133 mL d'eau déionisée dans un flacon de verre de 250 mL
 - Stériliser cette solution mère à 100°C à l'autoclave
- Suspension fille de concentration 150 µg.mL⁻¹
 - Prélever 500 µL de la solution mère à l'aide d'une pipette P1000 pour la diluer dans 4.5 mL d'eau déionisée dans un tube de 10 mL
 - Conserver à +4°C dans un flacon en verre de 50 mL

Solution d'amphotéricine B :

- Peser 2.5 mg d'amphotéricine B dans un bécher de 10 mL
- Compléter avec 2.5 mL d'eau déionisée à l'aide d'une pipette P5000
- Répartir 500 µL dans des tubes Eppendorf à l'aide d'une pipette P1000 et conserver à -18°C

ANNEXE 5 : Comptage des larves mortes et vivantes sur le répliquat du thiabendazole

Élevage 1		Répliquat 1		Répliquat 2		Répliquat 1	
TBZ		1	2	3	4	5	6
A	[C] µg/ml	Témoin -	0,2	Témoin -	0,2	Témoin	0,2
	Log ¹⁰ [C]		-0,7		-0,7		-0,7
	Mort	8	23	7	27	10	28
	Vivant	73	60	66	61	78	58
	Taux de mortalité %	9,9	27,7	9,6	30,7	11,4	32,6
	Total	81	83	73	88	88	86
	%dev relatif	100	80,2	100	76,7	100	76,1
B	[C] µg/ml	0,02	0,4	0,02	0,4	0,02	0,4
	Log ¹⁰ [C]	-1,7	-0,4	-1,7	-0,4	-1,7	-0,4
	Mort	10	22	13	28	12	29
	Vivant	69	54	64	49	69	46
	Taux de mortalité %	12,7	28,9	16,9	36,7	14,8	38,7
	Total	79	76	77	77	81	75
	%dev relatif	96,9	78,8	91,9	70,4	96,1	69,2
C	[C] µg/ml	0,05	0,75	0,05	0,75	0,05	0,75
	Log ¹⁰ [C]	-1,3	-0,12	-1,3	-0,12	-1,3	-0,12
	Mort	13	44	16	49	13	52
	Vivant	68	28	68	34	64	26
	Taux de mortalité %	16,1	61,1	19,1	59	16,9	66,7
	Total	81	72	84	83	77	78
	%dev relatif	93,1	43,1	89,5	45,3	93,8	37,6
D	[C] µg/ml	0,1	1,5	0,1	1,5	0,1	1,5
	Log ¹⁰ [C]	-1	0,17	-1	0,17	-1	0,17
	Mort	20	56	21	58	12	59
	Vivant	64	9	63	11	62	3
	Taux de mortalité %	21	86,2	25	84,1	16,2	95,2
	Total	84	65	84	69	74	62
	%dev relatif	84,5	15,4	82,9	17,6	94,5	5,5

ANNEXE 6 : Résultats de développement larvaire dans le thiabendazole

Elevage 1 :

C (µg/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.02	96.9	91.9	96.1
0.05	93.1	89.5	93.8
0.1	84.5	82.9	94.5
0.2	80.2	76.7	76.1
0.4	78.8	70.4	69.2
0.75	43.1	45.3	37.6
1.5	15.4	17.6	5.5

Elevage 2 :

C (µg/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.02	100	99.1	95.9
0.05	73.3	75.9	75.7
0.1	66.9	56.3	52.5
0.2	42.6	35.6	35.2
0.4	20.4	24.3	34.8
0.75	13.5	1.22	20
1.5	2.6	0	5.6

Elevage 3 :

C (µg/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.02	93.4	93.6	91.6
0.05	96.3	89.5	95.8
0.1	81.8	86.05	80.8
0.2	60.7	67.7	54.02
0.4	38.6	54.5	44.1
0.75	19.3	30.5	13.9
1.5	1.2	7.03	3.5

ANNEXE 7 : Résultats de développement larvaire dans le lévamisole

Elevage 1 :

C (µg/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.06	65.3	71	76.2
0.12	48.3	47.9	40.5
0.25	38.9	30.3	28
0.5	28.3	28.3	27.2
1	14.5	7.7	10.4
2	3.6	0	3.5
4	0	0	0

Elevage 2 :

C (µg/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.06	73.8	84.6	79.8
0.12	59.9	78.0	76.4
0.25	51.6	59.1	68.9
0.5	2.3	5.2	1.5
1	0	0	0
2	0	0	0
4	0	0	0

Elevage 3 :

C (µg/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.06	87.02	83.3	87.6
0.12	69.8	73.3	62.3
0.25	30.66	44.5	30.6
0.5	10.22	14.5	2.3
1	1.15	2	0
2	0	0	0
4	0	0	0

ANNEXE 8 : Résultats de développement larvaire dans l'éprinomectine

Elevage 1 :

C (ng/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.2	84.3	79.5	88
0.4	96.2	86	100
0.8	72.9	64.8	79.4
1.6	60.8	55.6	85.5
3.1	56.3	52.7	73.8
6.25	41.6	42	60.4
12.5	35.5	31.2	46.5
25	20.9	55.6	35.3
50	3.9	7.6	12.1
100	0	0	0
200	0	0	0

Elevage 2 :

C (ng/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.2	93.9	92.9	96.7
0.4	97.9	97.7	85.4
0.8	86.8	86.6	82
1.6	74.5	69	80
3.1	74.2	72.5	77.6
6.25	65.6	58	52.6
12.5	53.3	50	51.3
25	59.5	51.1	35.1
50	100	100	34.9
100	2	5	0
200	0	0	0

Elevage 3 :

C (ng/mL)	Répliquat 1	Répliquat 2	Répliquat 3
0.2	93.8	97.4	93.7
0.4	99.5	97	100
0.8	84	93.1	77.5
1.6	84.1	80.4	78.5
3.1	79.3	76.2	68.6
6.25	72.6	72	65.4
12.5	64.5	67.8	57.1
25	49.8	50	49.4
50	30.8	35	37.5
100	19.7	22	28.1
200	0	4	7.9

ETUDE IN VITRO DES RESISTANCES DES STRONGLES DIGESTIFS DES CAPRINS AUX ANTIPARASITAIRES EN AUVERGNE RHONE ALPES

Auteur

TRINDER Justine

Résumé

Ce manuscrit sur l'étude de la résistance, toujours croissante, des strongles des caprins aux antiparasitaires, visait à étudier une prévalence de résistance dans des élevages de la région Auvergne-Rhône-Alpes. Dans une première partie, nous faisons une synthèse des connaissances sur la biologie des strongles l'étude clinique du parasitisme par les strongles digestifs, et évoquons les solutions de gestion du parasitisme. Nous faisons ensuite une synthèse de la prévalence et des mécanismes de la résistance aux différents traitements antiparasitaires, et décrivons les différentes méthodes pour évaluer et maîtriser les résistances. La partie expérimentale consiste en la réalisation de tests de développement larvaire, dans lesquels les résistances au thiabendazole, au lévamisole et à l'éprinomectine étaient testées. Les résultats ont été interprétés par rapport à une dose discriminante référencée par des auteurs. Celle de l'éprinomectine est déterminée arbitrairement selon des résultats observés dans la littérature. Il en résulte que le thiabendazole ne fonctionne plus dans les 3 élevages étudiés, et que le lévamisole, dans un élevage. L'éprinomectine semble résistante selon le seuil établi pour les 3 élevages. Cependant, un FECRT réalisé sur un des 3 élevages montre que l'éprinomectine est encore fonctionnelle. Cette contradiction dans les résultats soulève des interrogations quant au protocole de notre LDA, et du seuil de résistance déterminé.

Mots-clés

Strongles, Caprins, Anthelminthiques, Résistance

Jury

Président du jury : Pr **ALLAOUCHICHE Bernard**

Directeur de thèse : Dr **BOURGOIN Gilles**

1er assesseur : Dr **BOURGOIN Gilles**

2ème assesseur : Pr **ZENNER Lionel**