

# Résistance aux benzimidazoles chez les nématodes gastro-intestinaux parasites de petits ruminants : diagnostic moléculaire et stratégies de traitements

A. SILVESTRE, J. CABARET

INRA, Pathologie Aviaire et Parasitologie, 37380 Nouzilly

**RESUME** – En France, la résistance aux benzimidazoles (BZ) chez les nématodes parasites touche la plupart des élevages de petits ruminants élevés à l'herbe, mais aucun cas n'a encore été observé chez les bovins. Les résistances vis-à-vis des autres familles d'anthelminthiques à spectre large d'action (les imidazothiazoles et les lactones macrocycliques) commencent à apparaître. Les techniques parasitaires de diagnostic de la résistance comme le test de réduction de l'excrétion des œufs ou l'inhibition de l'éclosion des œufs estiment le niveau de résistance de la communauté de nématodes sans permettre de distinguer finement le niveau de résistance de chaque espèce qui la compose. Pour optimiser l'usage des molécules anthelminthiques, il faut identifier d'une part, les espèces de nématodes présentes dans la communauté parasitaire du troupeau, et d'autre part, le statut de résistance de chaque espèce de la communauté parasitaire.

Nous avons développé un outil moléculaire de diagnostic de la résistance aux BZ. Fondée sur une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), notre technique assure la détection de la mutation ponctuelle responsable de la résistance aux BZ chez les nématodes gastro-intestinaux. L'avantage majeur de ce diagnostic réside dans la sensibilité de la mesure : la résistance peut être détectée dès son apparition, permettant ainsi d'adapter les traitements. L'identification des espèces résistantes permet de mettre en œuvre des traitements spécifiques, et l'information fournie constitue une aide à la décision, en terme de contrôle du parasitisme. Nous envisageons de diffuser cet outil par l'intermédiaire des techniciens de l'élevage, des groupements techniques et des laboratoires des services vétérinaires. Outre les applications de cet outil pour les petits ruminants, il est possible de développer cette approche pour les bovins, chez lesquels les techniques classiques de détection de la résistance sont peu fiables.

## Benzimidazoles resistance in gastro-intestinal nematodes, parasites of small ruminant: molecular diagnostic and drenching plan

A. SILVESTRE, J. CABARET

INRA, Pathologie Aviaire et Parasitologie, 37380 Nouzilly

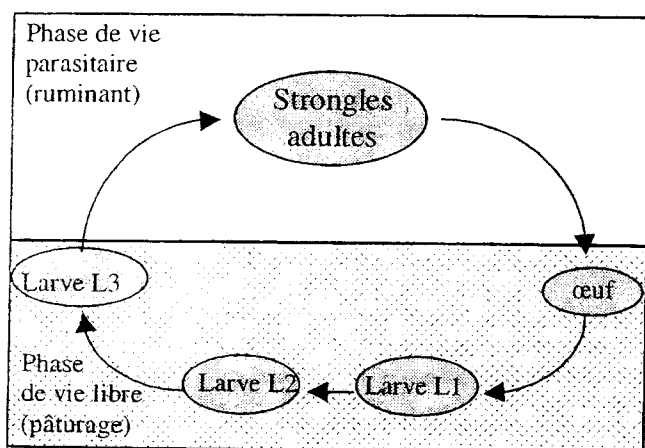
**SUMMARY** – Benzimidazole (BZ) resistance in nematode parasites is becoming an increasing issue for most of grazing small ruminant in France, but no case has been recorded in cattle. Resistance cases are emerging in other broad spectrum anthelmintics (imidazothiazoles and macrocyclic lactones). Classical methods for the diagnosis of anthelmintic resistance, like the faecal egg count reduction test or the egg hatch essay, estimate the resistance of the whole nematode community, without distinguishing each nematode species resistance level precisely. To maintain efficacy of available anthelmintics, it is necessary to identify: i) nematode species represented in the parasite community harboured by the herd, ii) and the resistance status of each nematode species of the parasite community.

We developed a molecular tool for the diagnosis of BZ-resistance. Based on a polymerase chain reaction (PCR), our technique detects the punctual mutation responsible for BZ-resistance in gastro-intestinal nematodes. The main advantage of this diagnosis concerns limit of detection: resistance can be detected during its very first step, which can help in drenching plan. Identification of resistant nematode species allows the use of narrow spectrum anthelmintics when feasible and supplied information are helpful to control nematode infections. We propose to extend the use of this molecular tool by the way of technicians in animal breeding, veterinary societies and veterinary laboratories. It is possible to develop this molecular tool for nematodes species of cattle, for which classical diagnosis techniques of resistance are less reliable.

## INTRODUCTION

Les strongles gastro-intestinaux sont des nématodes parasites du tractus digestif des ruminants. Une synthèse récente présente les aspects d'épidémiologie et de traitements des strongyloses des petits ruminants in (Cabaret, 2000). Les strongles ont un cycle monoxène, comportant une phase de vie libre sur le pâturage et une phase de vie parasitaire dans l'hôte (Figure 1). Les ruminants s'infestent en ingérant de l'herbe contenant les larves infestantes de stade 3. Ces larves pénètrent dans la muqueuse digestive et muent en stade 4 qui quittent la muqueuse pour la lumière intestinale où elles muent en stade 5. Après maturation sexuelle, les strongles adultes émettent des œufs qui sont excrétés dans les matières fécales du ruminant. Les œufs éclosent en libérant les larves de stade 1. Deux mues successives permettent d'obtenir le troisième stade larvaire, qui est le stade infestant. En conditions climatiques optimales, un délai de 3 semaines sépare l'infestation des ruminants de l'émission des premiers œufs de strongles dans les matières fécales.

Figure 1  
Cycle parasitaire des strongles gastro-intestinaux



Les infestations par les strongles gastro-intestinaux touchent la quasi totalité des élevages de ruminants à l'herbe en France (Cabaret, 1994). Les infestations naturelles comportent plusieurs espèces qui constituent la communauté parasitaire. Les espèces majeures en climat tempéré sont *Teladorsagia circumcincta* et *Haemonchus contortus* localisées dans la caillette et *Trichostrongylus colubriformis*, dans l'intestin grêle des petits ruminants.

Les strongles induisent une baisse de l'appétit des ruminants, et provoquent des lésions des muqueuses digestives. L'ensemble de ces effets aboutit à la malabsorption des nutriments et à des modifications du métabolisme. Dans la plupart des cas en zone tempérée, les infestations demeurent sub-cliniques mais génèrent des pertes de production (Yvore et Hoste, 1990).

Pour minimiser les pertes économiques, l'éleveur doit mettre en place une stratégie de contrôle de l'infestation. Il est possible d'agir sur la phase parasitaire et / ou sur la phase libre du cycle parasitaire des strongles gastro-intestinaux. La sélection d'animaux résistants à l'infestation, la vaccination ainsi que la lutte biologique à l'aide de champignons prédateurs demeurent des approches expérimentales. En revanche, la gestion des pâturages et l'usage des anthelminthiques constituent les deux moyens de contrôle disponibles sur le terrain.

On distingue trois familles d'anthelminthiques à spectre large d'action, efficaces contre les strongles gastro-intestinaux et les strongles pulmonaires (Tableau 1) : les imidazothiazoles et les tétrahydropyrimidines, les lactones macrocycliques et les benzimidazoles (BZ). Chaque famille est caractérisée par un mode d'action qui lui est propre mais différentes molécules de la même famille ont le même mode d'action. Les BZ sont bon marché, caractérisés par un fort indice thérapeutique et certaines molécules de cette famille ne laissent que peu de résidus dans le lait (fenbendazole-Panacur®, oxfenbendazole-Synan-

thic®, fébantel-Rintal®). L'ensemble de ces qualités en font la famille de choix en élevage laitier. Parmi d'autres facteurs, l'usage répété d'une seule famille d'anthelminthique pendant une longue période a favorisé l'émergence de souches de nématodes gastro-intestinaux résistantes à ces molécules. Dans la région Ouest de la France, des populations de nématodes gastro-intestinaux résistantes aux BZ existent dans environ un élevage ovin sur deux et dans la quasi totalité des élevages de chèvres élevées au pâturage (Chartier *et al.*, 1998). En revanche, aucun cas de résistance n'a encore été observé chez les bovins, en France. Les résistances vis-à-vis des autres familles d'anthelminthiques à spectre large d'action (les imidazothiazoles / tétrahydropyrimidines et les lactones macrocycliques) sont moins bien documentées, mais elles commencent à apparaître. Dans cette synthèse, seront présentées les techniques parasitaires de diagnostic de la résistance aux BZ, ainsi qu'un outil moléculaire récemment développé. L'intérêt de ces approches sera discuté en terme d'aide à la décision dans le contexte du contrôle du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants.

## 1. TECHNIQUES PARASITAIRES DE DIAGNOSTIC DE LA RESISTANCE A UN ANTHELMINTHIQUE

Il existe plusieurs techniques parasitaires de diagnostic de la résistance à un anthelminthique (pour synthèse, Beugnet et Kerboeuf, 1997). La World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP, a publié des recommandations vis-à-vis de la mise en oeuvre de ces tests ainsi que de leur interprétation (Coles *et al.*, 1992 ; Wood *et al.*, 1995). Les deux tests principaux de la réduction de l'excrétion des œufs et de l'inhibition de l'éclosion des œufs sont rappelés brièvement.

### 1.1. TEST DE RÉDUCTION DE L'EXCRÉTION DES ŒUFS

Le test de réduction de l'excrétion des œufs permet de déterminer l'efficacité d'un traitement anthelminthique, *in vivo*. Il consiste en deux examens coproscopiques (mesure du nombre d'œufs de strongles par gramme de matière fécale, OPG), réalisés sur un groupe de 10 animaux témoins, non traités depuis au moins un mois, et sur un second groupe de 10 animaux, 11 à 14 jours après le traitement anthelminthique. Le taux de réduction de l'excrétion des œufs est calculé. La communauté parasitaire est déclarée résistante si le taux de réduction est inférieur à 90 %. La réalisation d'un test de réduction de l'excrétion des œufs de strongles coûte approximativement 1200 F à un éleveur : 20 coproscopies à 50 F environ et éventuellement une coproculture pour identifier les espèces (200 F).

### 1.2. TEST D'INHIBITION DE L'ÉCLOSION DES ŒUFS

Lors du test d'inhibition de l'éclosion des œufs (Coles *et al.*, 1992 ; Wood *et al.*, 1995), un nombre constant d'œufs de strongles est mis en contact avec une gamme de concentrations croissantes de l'anthelminthique. Après 48 heures d'incubation, les œufs non éclos sont dénombrés pour chaque concentration d'anthelminthique et la dose létale 50 % (DL<sub>50</sub>) est déterminée. L'échantillon est considéré résistant si la DL<sub>50</sub> est supérieure à 0.1 mg de thiabendazole / ml. Ce test est réservé aux BZ, car il utilise les propriétés ovicides de cette famille d'anthelminthiques. Ce test représente un coût de 1000 F pour l'éleveur.

### 1.3. LIMITES ET CONTRAINTES DES TECHNIQUES PARASITAIRES

Bien que les techniques parasitaires de diagnostic de la résistance présentent l'avantage d'être relativement simples à mettre en oeuvre, elles ne sont pas adaptées à la détection de la résistance à l'échelle de la communauté parasitaire. En général, la mesure des OPG est représentative du nombre de vers adultes hébergés par les ruminants (McKenna, 1987). Cette relation est vérifiée dans le cas d'une infestation par une seule espèce de strongles gastro-intestinaux, où tous les vers adultes sont caractérisés par la même fécondité. En revanche, la mesure des OPG est moins représentative du nombre de vers adultes dans le cas d'une infestation par plusieurs espèces de strongles présentant des taux de ponte différents : la valeur des

**Tableau 1**  
**Molécules et noms génériques des trois familles d'anthelminthiques à spectre large d'action**

Famille	Molécule	Nom générique	Délais pour la viande et les abats, pour le lait
Benzimidazoles	Albendazole	Albendoral <sup>®</sup> , Bilutac <sup>®</sup> , Disthelm <sup>®</sup> ,	10 jours, interdit en lactation
		Valbazen <sup>®</sup>	0 jours, 0 traite
		Proftril <sup>®</sup> , Rumifuge <sup>®</sup>	10 jours, 0 traite
	Fébantel	Drontal <sup>®</sup> , Rintal <sup>®</sup>	7 (bovin) à 10 jours (caprins et ovins), 0 traite
	Thiabendazole	Némapan <sup>®</sup> , Stronglozole <sup>®</sup>	14 jours, 6 traites
	Oxibendazole	Oxibenmix <sup>®</sup>	14 jours, 4 traites
	Fenbendazole	Panacur <sup>®</sup>	8 jours, 0 traite
	Oxfendazole	Oxfenil <sup>®</sup> , Synanthic <sup>®</sup> Rapidose Farmintic <sup>®</sup>	10 (bovins) à 14 jours (ovins, caprins), 0 traite 6 mois, interdit en lactation
Imidazothiazoles et Tétrahydropyrimidines	Lévamisole	Anthelminticide <sup>®</sup> , Biaminthic <sup>®</sup> , Lévanol <sup>®</sup> ,	3 jours, interdit en lactation 28 jours, 10 traites 3 jours, 2 traites 3 jours, 1 traite 16 semaines, interdit en lactation 14 jours, 2 traites 3 jours, 4 traites 14 (bovins) à 28 (ovins) jours, interdit en lactation 0 jours, 0 traite
		Lobiavers <sup>®</sup> , Némisole <sup>®</sup>	
		Bivermyl <sup>®</sup> , Miclozan <sup>®</sup> , Nilzan <sup>®</sup>	
		Capizol <sup>®</sup> , Lévisole <sup>®</sup> , Niratil <sup>®</sup> , Ripercol <sup>®</sup>	
		Thelmizole <sup>®</sup>	
		Chronomintic <sup>®</sup>	
		Imena <sup>®</sup> L, Spectril <sup>®</sup>	
		Ivecide <sup>®</sup> , Polystrongle <sup>®</sup>	
		Parsifal <sup>®</sup>	
		Morantel	
Lactones macrocycliques	Abamectine	Enzec <sup>®</sup>	35 jours, interdit en lactation
	Doramectine	Dectomax <sup>®</sup>	35 (intramusculaire) à 56 jours (sous-cutanée), interdit en lactation
	Eprinomectine	Eprinex <sup>®</sup>	28 jours, 0 traite
	Ivermectine	Ivomec <sup>®</sup>	28 jours, interdit en lactation
		Oramec <sup>®</sup>	3 jours, interdit en lactation
	Moxidectine	Cydectine <sup>®</sup>	14 (orale) à 35 jours (injectable), interdit en lactation

OPG résulte du nombre de femelles adultes et du nombre d'œufs de strongles émis par femelle. La fécondité des vers femelles est un paramètre très variable d'une espèce à l'autre : une femelle d'*H. contortus* est en moyenne 50 fois plus féconde qu'une femelle de *T. colubriformis*. Pour rester fiable, la valeur des OPG doit être corrigée en fonction de la composition en espèce de la communauté parasitaire. En première approximation, la fréquence d'*H. contortus* dans la communauté est un bon facteur de correction (Cabaret *et al.*, 1998).

Chaque espèce de nématodes gastro-intestinaux est caractérisée par des exigences écologiques particulières qui engendrent des fluctuations saisonnières de la composition en espèces de la communauté parasitaire. *T. circumcincta* et *T. colubriformis* sont plutôt adaptées au climat froid et sec, tandis qu'*H. contortus* présente une survie optimale en climat chaud et humide. En début de printemps, (Figure 2A) on observe une infestivité résiduelle des pâturages : les larves infestantes présentes sur le pâturage sont des larves ayant survécu à l'hiver. En fin de printemps, le premier pic d'infestation des animaux résulte de la consommation de ces larves. Au cours de la saison de pâture, l'infestivité des pâturages est fortement augmentée : compte tenu de la fécondité des strongles, très peu de vers adultes sont nécessaires pour relancer le cycle parasitaire. En été, l'infestation des petits ruminants est dominée par *H. contortus*. En automne, on observe souvent un second pic d'infestation qui résulte de la forte contamination des pâturages par le maintien des ruminants sur la même parcelle. Schématiquement, on observe une communauté de printemps dominée par *T. circumcincta* et *T. colubriformis* et une communauté d'automne qui comporte les trois espèces majeures en proportions variables selon les conditions climatiques locales. Pour tenir compte des fluctuations saisonnières de l'abondance des espèces, les deux tests précédemment décrits devraient être réalisés à deux périodes de l'année (fin de printemps et début d'automne) pour demeurer fiables. Le test de réduction de l'excrétion des œufs et le test d'inhibition de l'éclosion des œufs fournissent une mesure globale de la résistance, sur la communauté parasitaire dans son

ensemble. L'information fournie est donc d'un intérêt réduit : pour relier la résistance observée à une ou plusieurs espèces de la communauté, il serait nécessaire de réaliser une coproculture sur les matières fécales obtenues après le traitement anthelminthique, afin de récupérer des larves infestantes et de pouvoir faire la diagnose des espèces résistantes de façon relativement fiable. Ces procédures sont fastidieuses, pour un résultat peu satisfaisant.

Ces tests ne détectent la résistance que si plus de 25% des individus sont résistants (Martin *et al.*, 1989). Cette faible sensibilité des tests rend impossible le diagnostic de la résistance avant tout échec thérapeutique. Or, aucune étude n'a encore permis de mettre en évidence un phénomène de réversion de la résistance, même en absence de traitement anthelminthique (Borgsteede et Duyn, 1989 ; Hall *et al.*, 1982). Il est donc fondamental de pouvoir diagnostiquer les premières étapes de développement de la résistance afin de mettre en œuvre des stratégies adaptées de contrôle du parasitisme, dans le but de préserver le plus longtemps possible l'efficacité des anthelminthiques disponibles.

## 2. DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE LA RESISTANCE AUX BENZIMIDAZOLES

Notre étude a porté sur les BZ pour deux raisons : d'une part, cette famille d'anthelminthiques est largement utilisée sur le terrain et d'autre part, la résistance vis-à-vis des BZ présente un déterminisme génétique simple. Une mutation ponctuelle en position 200 du gène de la  $\beta$ -tubuline, qui substitue une phénylalanine (Phe) par une tyrosine (Tyr), confère la résistance aux BZ chez les trois espèces de nématodes gastro-intestinaux *T. circumcincta*, *H. contortus* et *T. colubriformis*. Nous avons cherché à mettre au point un outil de diagnostic moléculaire de cette mutation sur le stade infestant. En effet, les larves de stade 3 constituent le matériel biologique idéal car elles sont facilement récupérées après la mise en culture des matières fécales des ruminants. Cette approche non destructive permet de réaliser des mesures répétables dans le temps, sur le même hôte.

## 2.1. TECHNIQUE DE PCR ALLÈLE SPÉCIFIQUE

Notre approche consiste dans un premier temps à déterminer l'espèce à laquelle la larve appartient puis dans un second temps à définir son statut de résistance par rapport aux BZ. L'identification de l'espèce est réalisée grâce au polymorphisme du gène de la  $\beta$ -tubuline. La localisation et le nombre de sites de coupure d'une enzyme de restriction définissent des fragments d'ADN de taille caractéristique chez chaque espèce. Ensuite, le statut de résistance vis-à-vis des BZ est étudié. La mutation de la  $\beta$ -tubuline génère trois génotypes : les individus homozygotes (Phe / Phe) et hétérozygotes (Phe / Tyr) sont sensibles au traitement, en revanche les individus homozygotes récessifs (Tyr / Tyr) survivent au traitement par les BZ. L'intérêt majeur de l'approche moléculaire réside dans la détection des premiers individus hétérozygotes (porteurs de l'allèle de résistance) avant tout échec thérapeutique de la molécule.

## 2.2. AVANTAGES DE CETTE TECHNIQUE

Les techniques parasitaires de diagnostic de la résistance reflètent plutôt l'histoire de la communauté parasitaire tandis que le typage moléculaire fournit une image instantanée du statut de résistance de chaque espèce de la communauté parasitaire. Le typage moléculaire caractérise le niveau de résistance de toutes les espèces présentes (avec une plus grande précision pour les espèces les plus abondantes), tandis que les tests parasitaires ne peuvent pas détecter la résistance si une seule espèce, peu représentée dans la communauté parasitaire, est résistante aux BZ.

Cette technique est d'une grande sensibilité : comparé aux tests parasitaires, le typage moléculaire permet la quantification de l'allèle de résistance au sein de chaque espèce qui compose la communauté parasitaire. Pratiquement, ce seuil de détection accorde un délai à l'éleveur pour changer sa stratégie de traitements anthelminthiques (choix de la molécule, et date de traitement) et réduire ainsi la pression de sélection qui favorise le développement de la résistance. Les approches fondées sur la mesure du niveau d'excrétion des œufs ne sont pas suffisamment informatives pour que l'éleveur puisse prendre une décision par rapport à la stratégie de traitements. Le coût d'un typage moléculaire peut être estimé à 1400 F, ce qui en fait un outil de diagnostic compétitif compte tenu de l'information fournie par cette approche.

## 3. INTERET DU DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DANS UNE STRATEGIE DE TRAITEMENT ANTHELMINTHIQUE

Dans le cas où une seule espèce de la communauté parasitaire est résistante, il est recommandé d'utiliser un anthelminthique à spectre étroit et de jouer avec les fluctuations saisonnières pour réduire la pression de sélection sur les autres espèces de strongles gastro-intestinaux, encore sensibles aux BZ. Par exemple si *H. contortus* s'avère être l'espèce résistante aux BZ, il est possible d'effectuer un traitement avec les salicylanilides (Closantel®) ou le Nitroxynil (Dovenix®) qui n'agissent que sur les espèces hématophages.

Si *T. circumcincta* et *H. contortus* sont résistantes aux BZ, il est recommandé de réaliser un traitement au tartrate de pyrantel (Vermirantel®). Ce schéma n'est pas approprié quand *T. colubriformis* est présente dans la communauté parasitaire car le tartrate de pyrantel n'est pas actif contre cette espèce de strongle chez les caprins (Chartier *et al.*, 1995).

En dernier lieu, si la résistance aux BZ touche la communauté parasitaire dans son ensemble, alors il est recommandé de changer de famille d'anthelminthiques. Le choix se porte alors vers les deux autres familles d'anthelminthiques à spectre large d'action : les lactones macrocycliques ou les imidazothiazoles / tétrahydropyrimidines, en fonction des contraintes de production de l'élevage (nature de la production et type d'élevage). L'objectif d'un traitement anthelminthique est double. A court terme, le traitement vise à réduire la charge parasitaire des ruminants afin de maintenir un bon niveau de production. A moyen terme, c'est la réduction de la contamination du pâturage par les œufs de strongles excrétés qui est visée. Ainsi,

pour prolonger l'efficacité d'un traitement anthelminthique, il est nécessaire de minimiser la ré-infestation des ruminants. L'usage de pâturages indemnes de larves infestantes ou des traitements anthelminthiques en relation avec les fluctuations saisonnières peuvent maintenir une faible infestation des ruminants.

Il est primordial de distinguer deux types de situations : les élevages indemnes de résistance anthelminthique et les élevages où la résistance anthelminthique est déjà présente. En effet, les recommandations adéquates dans un cas seraient catastrophiques dans l'autre cas.

Dans le cas des BZ, le fait que le déterminisme génétique de la résistance soit monogénique et corresponde à une mutation récessive explique la bonne corrélation, en général, entre la fréquence des traitements et le développement de la résistance aux BZ. Cependant, ce facteur n'est pas exclusif, et le rôle d'autres paramètres d'élevage a déjà été démontré (Silvestre *et al.*, *in press*). C'est pourquoi le "bon usage" des anthelminthiques passe par une diminution de leur fréquence d'utilisation et par une optimisation des dates de traitements.

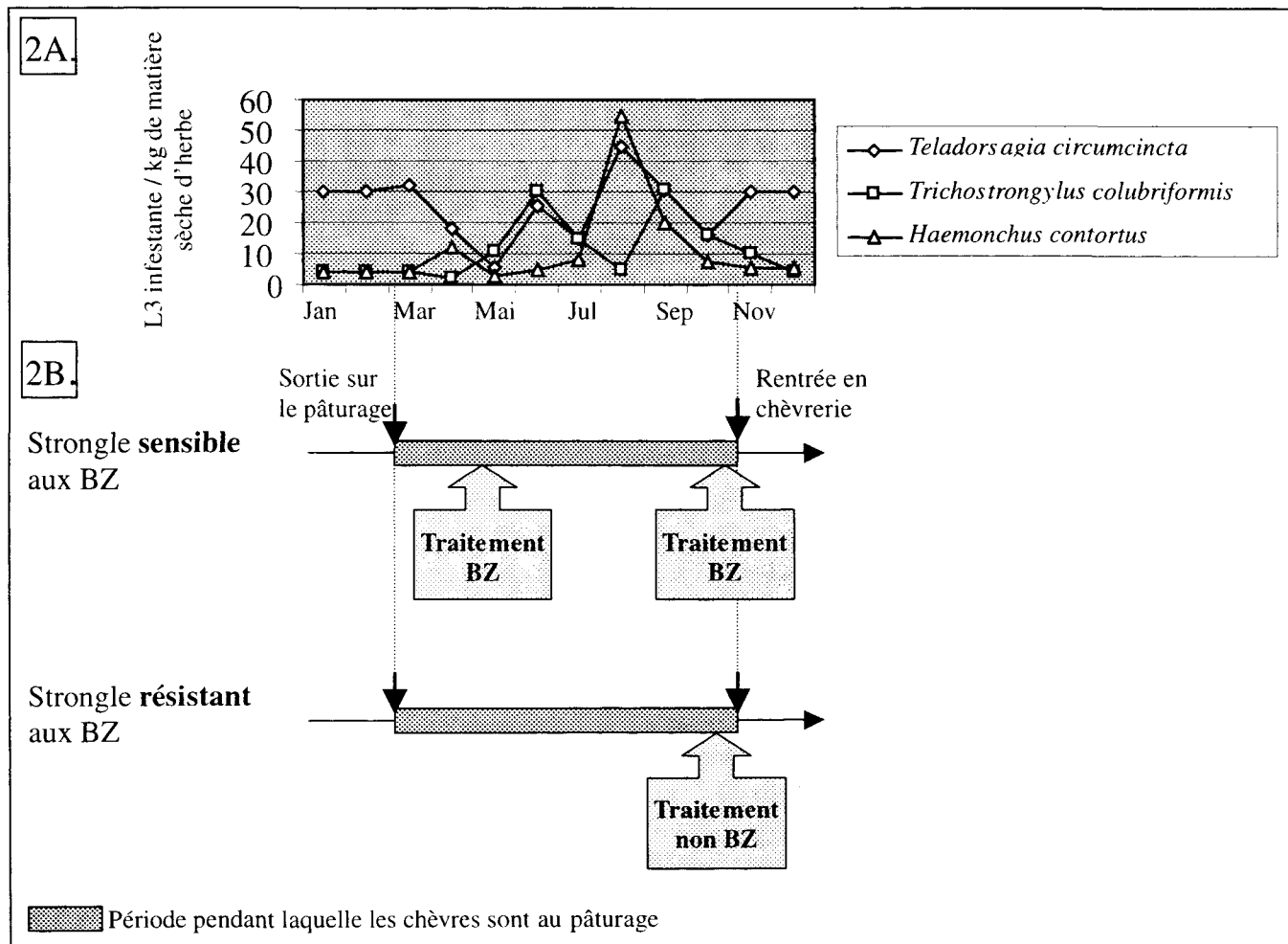
## 3.1. STRATÉGIE DE CONTRÔLE DES NÉMATODES GASTRO-INTESTINAUX EN ABSENCE DE RÉSISTANCE ANTHELMINTHIQUE

En absence de résistance anthelminthique, c'est la stratégie préventive du « treat and move » qui doit s'appliquer. Il s'agit de traiter les ruminants aux BZ puis de les placer sur un pâturage indemne de larves infestantes. Cette approche réduit l'intensité de la ré-infestation des ruminants. La contamination du pâturage est minimisée pendant une longue période. Pratiquement, on peut réaliser un traitement aux BZ lors de la rentrée des ruminants pour l'hiver, puis un second traitement lors du changement de pâturage en début de saison de pâture, pour éviter le pic d'infestation à la fin du printemps (Figure 2). En parallèle, il faut effectuer une veille, en vérifiant le maintien de l'efficacité des traitements anthelminthiques par le test de la réduction de l'excrétion des œufs de strongles dans les matières fécales des ruminants. Avant l'introduction de tout nouvel animal dans le troupeau, il est primordial de lui administrer un traitement par les BZ et de laisser l'animal en quarantaine jusqu'à la vérification de l'efficacité du traitement. Cela permet de ne pas introduire de strongles résistants dans une communauté parasitaire sensible. En cas de doute, il est recommandé d'utiliser d'autres familles d'anthelminthiques à spectre large d'action jusqu'à l'élimination complète de l'excrétion des œufs. Actuellement, aucun cas de résistance à plusieurs familles d'anthelminthiques n'a encore été enregistré en France métropolitaine, ce qui assure l'efficacité de cette approche. Si cette veille n'est pas effectuée consciencieusement, l'éleveur prend le risque d'introduire des nématodes gastro-intestinaux résistants aux BZ, ce qui est irréversible. Au mieux, on peut s'attendre à ce que la résistance aux BZ se maintienne sans augmenter. Plusieurs études ont déjà démontré le rôle de l'introduction de strongles résistants dans le développement de la résistance aux BZ dans des élevages caprins (Requejo-Fernandez *et al.*, 1997 ; Varady *et al.*, 1993). Dans cette approche préventive, les traitements anthelminthiques sont administrés lorsque la majorité de la population de nématodes gastro-intestinaux se trouve sous la forme parasitaire. En revanche, dans les élevages où la résistance anthelminthique est présente, cette stratégie aggraverait dramatiquement le développement de la résistance. En cas de résistance, après le traitement aux BZ, les ruminants n'hébergeant que des parasites résistants contamineraient un pâturage indemne de parasites avec des œufs de strongles résistants aux BZ et la sélection de la résistance serait accélérée (Barger, 1999).

## 3.2. STRATÉGIE DE CONTRÔLE DES NÉMATODES GASTRO-INTESTINAUX EN CAS DE RÉSISTANCE ANTHELMINTHIQUE

En cas de résistance aux BZ avérée, un schéma général peut être proposé pour contrôler le parasitisme (Figure 2B). La première mesure à prendre consiste à changer de famille d'anthelminthique. Le choix entre les imidazothiazoles / tétrahydropyrimidines et les lactones macrocycliques se fait en fonction des orientations de production (lait ou viande). Des

Figure 2A  
Evolution mensuelle de l'infestivité moyenne des pâturages d'après Mangeon (1986) et Kerboeuf (1985),  
2B Stratégies de traitements anthelminthiques pour contrôler les strongles sensibles et résistants aux benzimidazoles (BZ)  
chez les petits ruminants



aménagements de ce schéma général peuvent être faits en fonction de la conduite du troupeau (un seul lot ou en plusieurs lots en fonction des classes d'âge) et du type de l'élevage (agriculture biologique ou raisonnée) : si l'élevage n'est pas tourné vers la production laitière, un traitement en cours de saison de pâturage peut être effectué.

On distingue deux stratégies différentes : la stratégie d'évitement du parasite et la stratégie reposant sur l'élevage mixte ou alterné. La stratégie d'évitement vise à limiter le contact entre les larves infestantes et les petits ruminants. Les pâturages sont divisés en parcelles, qui sont pâturées par les animaux pendant quelques jours. Puis les animaux sont placés sur une autre parcelle, indemne de parasite. La durée pendant laquelle les parcelles sont mises au repos permet leur décontamination progressive. Cette approche n'est évidemment pas envisageable pour les éleveurs ne disposant que d'un seul parc où toute stratégie de gestion du pâturage est irréaliste. En revanche, elle est particulièrement adaptée aux élevages disposant d'au moins quelques hectares de pâturage. Bien que les grandes surfaces de pâturages diminuent la charge parasitaire moyenne des ruminants, elles n'empêchent pas toujours la sélection de la résistance. En pratique, une division du pâturage en 4 à 6 parcelles est classiquement recommandée, et un apport d'herbe à l'auge peut être envisagé pour les petites surfaces de pâturage. En climat tempéré, la survie d'une larve infestante sur le pâturage varie de 3 à 9 mois. Par conséquent, cette approche permet de diminuer le nombre de larves infestantes mais ne permet pas à elle seule le contrôle du parasitisme.

La seconde stratégie est l'élevage mixte ou alterné, sous réserve d'un contexte pathologique compatible. Le principe de cette méthode est de faire pâturer sur les mêmes pâturages, deux espèces de ruminants qui ne partagent pas les mêmes

espèces de parasites. En général, il s'agit d'une espèce de petits ruminants (ovin ou caprin) ou équine et bovine. Le nombre de larves infestantes disponibles pour l'hôte électif est réduit puisqu'une fraction de ces larves est ingérée par l'autre espèce d'hôte, chez laquelle elles ne s'installent pas. Une variante de ce système est le pâturage alterné. L'alternance entre les petits ruminants et les bovins est réalisée en fonction de l'abondance saisonnière des espèces de parasites. Ces deux approches sont difficilement applicables si la communauté parasitaire est dominée par *T. axei*. Cette espèce présente un spectre large d'hôtes (bovins, ovins, caprins et équins) qui réduit l'intérêt de l'élevage mixte ou alterné.

En fonction de la conduite du troupeau, la réduction de la pression de sélection (et donc la réduction du nombre de traitements anthelminthiques) peut être réalisée en traitant les animaux les plus parasités comme les chevrettes primipares et les meilleures productrices de lait du troupeau (Hoste *et al.*, 2000). Certains indicateurs (diarrhées, âge ou état physiologique) peuvent être de bons critères. Bien que de nombreuses infections puissent se manifester par des diarrhées, l'aspect des matières fécales peut permettre de déterminer la nécessité d'un traitement anthelminthique. Si les jeunes animaux sont séparés de leur mère, il est recommandé de traiter les jeunes et de les maintenir sur d'autres parcelles que celles pâturées par les mères. Enfin il est possible de ne traiter que les animaux les plus excréteurs d'œufs de strongles. Un suivi du niveau d'excrétion des œufs chez chaque animal du troupeau n'est pas envisageable. En revanche l'état physiologique des animaux constitue un bon indicateur : les femelles autour du part présentent une baisse de leur immunité qui se manifeste par une élévation importante de l'excrétion des œufs de strongles (Kerboeuf, 1979).

#### 4. QUAND RECOMMANDER LE TYPAGE MOLECULAIRE ?

Notre outil de typage moléculaire peut détecter des fréquences alléliques de l'ordre de 5 %. Si la résistance aux BZ n'est pas suspectée dans la région de l'élevage, on peut s'attendre à une fréquence de l'allèle de résistance extrêmement faible (moins de 1 %). Dans ce cas, le typage moléculaire nécessiterait un effort d'échantillonnage trop important pour fournir une mesure fiable de la fréquence de l'allèle de résistance, et cette approche n'est pas recommandée.

En revanche, si des cas de résistance aux BZ ont été suspectés sur la base de réduction de l'excrétion des œufs de l'ordre de 60 à 80 % après un traitement aux BZ, alors le typage moléculaire serait utile pour quantifier précisément la fréquence de l'allèle de résistance dans la ou les espèces de nématodes gastro-intestinaux en cause. Dans les stades précoces de développement de la résistance (5 % d'allèle de résistance dans une espèce), le typage moléculaire peut éviter de faire de graves erreurs de contrôle du parasitisme aboutissant à un problème clinique. Lorsque l'efficacité d'un anthelminthique commence à décliner, la question se pose de poursuivre son utilisation jusqu'à une efficacité presque nulle ou bien de changer immédiatement de famille anthelminthique.

Enfin, dans les cas avérés de résistance aux BZ, où la réduction de l'excrétion des œufs de strongles est inférieure à 60 %, le typage perd de son intérêt dans la mesure où la quantification de la fréquence de l'allèle de résistance n'apportera pas de solution au contrôle du parasitisme. Seul un changement de famille d'anthelminthique parviendra à réduire efficacement les charges parasitaires des ruminants.

En France, dans les élevages caprins, la résistance aux BZ présente une forte prévalence. Elle concerne parfois les principales espèces de la communauté parasitaire. Le typage moléculaire dans ces élevages présente peu d'intérêt pratique. En revanche, dans les élevages ovins et bovins, tout l'intérêt du typage moléculaire réside dans le diagnostic de la résistance dès son apparition.

Depuis quelques années l'agriculture biologique, les appellations d'origine contrôlée (A.O.C.) et les labels se développent. Les contraintes inhérentes à ces types d'élevages impliquent notamment qu'une large part de l'alimentation des animaux soit assurée par le pâturage. Les problèmes posés par le contrôle du parasitisme ont en partie été contournés dans de nombreux élevages caprins de la région Ouest de la France par l'élevage en conditions de hors-sol. Pour répondre au cahier des charges, des éleveurs qui souhaiteraient adhérer à l'agriculture biologique, aux A.O.C. ou aux labels sont aujourd'hui contraints de ressortir leurs animaux sur le pâturage. Ces éleveurs peuvent avoir intérêt à déterminer le statut de résistance de leur communauté parasitaire, puisque le parasitisme résiduel de leur troupeau est probablement faible.

#### PERSPECTIVES

Notre laboratoire a développé un test de détection de la résistance aux BZ, qui permet de déterminer la fréquence de l'allèle de résistance chez les trois principales espèces de nématode gastro-intestinaux de petits ruminants en climat tempéré. Ce test se pratique sur les larves, obtenues après la mise en culture de matières fécales. Il est possible de travailler sur des échantillons assemblés : les prélèvements de matières fécales d'une dizaine d'animaux du troupeau sont regroupés et trois à quatre mesures sont effectuées sur l'ensemble. Cette approche réduit considérablement les coûts de manipulations et statistiquement, les valeurs sont plus représentatives de l'élevage (Cabaret *et al.*, 1986). Le typage moléculaire est un test de dépistage performant et compatible avec les contraintes du terrain. Nous souhaiterions diffuser l'usage de ce test auprès des techniciens de l'élevage, des groupements techniques et des laboratoires des services vétérinaires. Ce test nécessite un matériel d'analyse actuellement disponible dans la majorité des laboratoires vétérinaires. Le « savoir-faire » pourrait s'acquérir par le biais de notre laboratoire, lors d'une formation à la fois théorique et pratique.

En comparant les coûts des différents diagnostics de la résistance anthelminthique au regard de la qualité de l'information

fournie à l'éleveur, l'intérêt du typage moléculaire dépasse largement celui des tests parasitaires. Pour un investissement comparable, on détermine précisément la composition de la communauté parasitaire et le statut de résistance de chaque espèce qui la compose, alors que les tests classiques fournissent un niveau de résistance relativement peu précis et qui caractérise la communauté parasitaire dans son ensemble.

Le développement de ce test moléculaire pour d'autres espèces parasites que *T. circumcincta*, *H. contortus* et *T. colubriformis* est envisageable. Notre laboratoire ne souhaite pas s'engager dans le diagnostic de routine, dans la mesure où nous proposons d'assurer la formation à cette technique. Ce test moléculaire devrait être très utile pour les parasites de bovins chez lesquels aucun cas de résistance anthelminthique n'a encore été enregistré en France. Les caractéristiques des infestations chez les bovins (faible excrétion d'œufs de strongles) rendent peu fiables les tests parasitaires de diagnostic de la résistance. L'usage du typage moléculaire pourrait confirmer l'absence réelle de résistance anthelminthique ou bien mettre en évidence les stades précoces de la résistance chez les parasites de bovins. Cette approche est d'autant plus nécessaire que les recommandations d'élevage mixte de petits ruminants avec les bovins se répandent. Des risques de transmission de la résistance aux autres espèces de ruminants sont possibles avec les genres *Ostertagia* et *Cooperia*. Récemment, une souche de *T. axei* résistante aux BZ a été observée dans un élevage ovin en Auvergne. Ce premier cas doit encore être confirmé, cependant, il mérite d'être pris en considération compte tenu du large spectre d'hôtes de *T. axei* (ovins, bovins, caprins et équins) et des risques de propagation de la résistance aux BZ. L'évolution de la résistance aux BZ dans les élevages de petits ruminants indiquent que son développement est irréversible : dans de très rares cas, la résistance se maintient à un très faible niveau pendant de nombreuses années, cependant, dans la majorité des cas, la résistance aux BZ se développe rapidement, pour atteindre l'échec thérapeutique au bout de quelques années. Les autres stratégies de contrôle du parasitisme étant très réduites actuellement, il est impératif de pouvoir diagnostiquer les toutes premières étapes d'apparition de la résistance afin de limiter son développement. Le diagnostic moléculaire de la résistance aux BZ présenté ici constitue un moyen d'atteindre cet objectif.

N.B. Les auteurs ont privilégié les synthèses bibliographiques, en français, lorsque cela était possible.

- Barger, I. A. 1999. *Int. J. Parasitol.*, 29, 41-47  
Beugnet, F., Kerboeuf, D. 1997. *Le Point Vét.* 28, 1949-56  
Borgsteede, F. H. M., Duyn, S.P.J. 1989. *Res. Vet. Sci.*, 47, 270-272  
Cabaret, J. 1994. *Bull. G. T. V.*, 122, 59-65  
Cabaret, J. 2000. *Action Vet.*, 1525, I-VII  
Cabaret, J., Gasnier, N., Jacquiet P. 1998. *Parasite*, 5, 137-142  
Cabaret, J., Mangeon, N., Cabourg, C. 1986. *International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 292-295  
Chartier, C., Pors, I., Benoit, C. 1995. *Vet. Parasitol.*, 59, 69-73  
Chartier, C., Pors, I., Hubert, J., Rocheteau, D., Benoit, C., Bernard, N. 1998. *Small Rum. Res.*, 29, 33-41  
Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J. 1992. *Vet. Par.*, 44, 35-44  
Hall, C. A., Ritchie, L., Kelly, J. D. 1982. *Res. Vet. Sci.*, 33, 54-57  
Hoste, H., Lefrileux, Y., Pommaret, A., Soubeyrat, F., Fernandez-Requejo, J. A., Martinez, A., Meana, A., Rojo-Vazquez, F. A., Osoro, K., Ortega-Mora, L. M. 1997. *Vet. Par.*, 73, 83-88  
Ferrer, M. 2000. *Renc. Rech. Ruminants*, 7, 91-94  
Kerboeuf, D. 1979. *Bull. G. T. V.*, 2, 33-42  
Kerboeuf, D. 1985. *Res. Vet. Sci.*, 38, 364-367  
Mangeon, N. 1986. Thèse, ENSA (Montpellier), 129 pp.  
Martin, P. J., Anderson, N., Jarrett, R.G. 1989. *Aust. Vet. J.*, 66, 236-240  
McKenna P. B. 1987. *N. Z. Vet. J.*, 35, 94-97  
Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Humbert, J.-F., Chartier, C., Cabaret, J. 2002. *Vet. Res.*, in press  
Varady M., Praslicka, J., Corba, J., Vesely, L. 1993. *Vet. Rec.*, 132, 387-388  
Wood, I. B., Amaral, N. K., Bairden, K., Duncan, J. L., Kassai, T., Malone, J. B., Jr., Pankavich, J. A., Reinecke, R. K., Slocombe, O., Taylor, S. M., Vercruysee, J. 1995. *Vet. Par.*, 58, 181-213  
Yvone, P., Hoste, H. 1990. *Rev. Méd. Vét.*, 141, 729-735