

Le contrôle biologique par les champignons nématophages comme méthode alternative à l'utilisation des anthelminthiques chez la chèvre : étude de l'efficacité, interaction avec un traitement par le thiabendazole

C. PARAUD, C. CHARTIER
AFSSA, Laboratoire d'Etudes et de Recherches Caprines, BP 3081, 60 rue de Pied de Fond, 79012 Niort Cedex

RESUME - La forte prévalence des résistances des nématodes aux benzimidazoles dans les élevages caprins français oblige à envisager des méthodes alternatives non chimiques de contrôle des helminthoses telles que le contrôle biologique. La capacité du champignon nématophage *Duddingtonia flagrans*, administré par voie orale à des chèvres, à réduire le développement larvaire de *Teladorsagia circumcincta* et de *Trichostrongylus colubriformis* et la survie des larves 1 de *Muellerius capillaris* a été évaluée. D'autre part, l'interaction de *D. flagrans* et du thiabendazole, un benzimidazole possédant des propriétés antifongiques, a été testée. *D. flagrans* à la dose de 5×10^5 spores/kg de poids vif par jour réduit de plus de 80 % le développement larvaire des strongles digestifs. A l'inverse, aucun effet n'a été mis en évidence sur *M. capillaris*. D'autre part, si le thiabendazole a exercé un fort effet fongicide sur *D. flagrans in vitro*, cette interaction n'a pas été mise en évidence *in vivo*, en raison de l'inhibition du développement larvaire de *T. colubriformis* dans les matières fécales par le thiabendazole.

Biological control with nematophagous fungi as alternative pathways for nematodes control in goats : efficacy, impact of a treatment by thiabendazole

C. PARAUD, C. CHARTIER
AFSSA, Laboratoire d'Etudes et de Recherches Caprines, BP 3081, 60 rue de Pied de Fond, 79012 Niort Cedex

SUMMARY - The high prevalence of benzimidazole resistance of nematodes in French grazing goats flocks leads to define nematode-control schemes based on integrated approaches with non-chemical options like biological control. The effect of the daily feeding of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* to goats on the third stage larvae (L3) of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* and on the survival of the first stage larvae (L1) of *Muellerius capillaris* was examined in faeces culture. On the other hand, the effect of a benzimidazole treatment with thiabendazole on *D. flagrans* was tested. Reductions in development of digestive nematodes larvae in fungi groups compared to control groups were more than 80 % at the dose rate of 5×10^5 spores/kg body weight per day. On the contrary, there was no difference on the survival of *M. capillaris* L1 between the 2 groups receiving or not the fungi. Thiabendazole exerts a high fungicidal effect on *D. flagrans in vitro* but no effect was seen in an *in vivo* assay because of the inhibition of the larval development of *T. colubriformis* by thiabendazole.

INTRODUCTION

La forte prévalence des nématodes résistants aux anthelminthiques dans les élevages caprins français (Chartier *et al*, 1998, Chartier *et al*, 2001) ainsi que la limitation du nombre de traitements chimiques dans le mode de production biologique imposent de définir de nouvelles méthodes de contrôle des helminthes. Différentes options sont envisagées, parmi lesquelles figure le contrôle biologique par les champignons nématophages. Ces champignons naturellement présents dans le sol se nourrissent de larves de nématodes. Leur administration sous forme de spores par voie orale aux animaux permet de réduire le développement larvaire dans les matières fécales et ainsi de limiter la contamination de la pâture. L'espèce la plus utilisée expérimentalement actuellement, *Duddingtonia flagrans*, a démontré son efficacité à réduire de plus de 90 % le nombre de larves infestantes de différents strongles quand il est administré sous forme de spores par voie orale à des veaux, brebis, porcs et chevaux (Larsen, 2000). Peu d'études ont été menées chez les caprins. Les essais présentés ici avaient pour objectifs :

- 1. la mise en évidence de l'activité de *D. flagrans* sur le développement des larves infestantes des 2 strongles digestifs des caprins les plus prévalents en France (Chartier et Reche, 1992) : *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis* et sur la survie des larves 1 de *Muellerius capillaris* (strongle respiratoire).
- 2. l'exploration d'un éventuel facteur de variation du niveau de réduction : le traitement des chèvres par les benzimidazoles possédant des propriétés fongicides, traitement pouvant être réalisé simultanément à l'administration des spores en vue d'éliminer les nématodes adultes.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. ANIMAUX ET PARASITES

Des chèvres de réforme, issues d'élevages pratiquant le zéro-pâturage, ont été infestées expérimentalement soit par 7500 larves infestantes de *Tel. circumcincta* par chèvre soit par 7500 larves infestantes de *T. colubriformis* résistant aux benzimidazoles (BZD) par chèvre, et maintenues par la suite en claustration. Un autre lot de chèvres de réforme provenant d'un élevage exploitant le pâturage et naturellement infestées a été utilisé pour l'essai avec *M. capillaris*. La moitié de chaque lot a reçu quotidiennement 5*10⁵ spores de *D. flagrans*/kg de poids vif par chèvre, l'autre moitié servant de témoin négatif.

1.2. CHAMPIGNON

La souche Troll A de *Duddingtonia flagrans* a été utilisée. Les spores ont été produites sur des graines de millet, séchées et

conditionnées par Chr. Hansen Biosystems A/S, Hørsholm, Danemark.

1.3. ANTHELMINTHIQUES

Notre choix parmi tous les membres de la famille des (BZD) s'est porté sur le thiabendazole (TBZ), chef de file possédant une activité fongicide reconnue.

1.4. SCHÉMAS EXPÉRIMENTAUX ET TECHNIQUES PARASITOLOGIQUES

1.4.1. Activité de *D. flagrans*

1.4.1.1. Strongles digestifs
A partir de prélèvements individuels, on réalise des coproscopies donnant le nombre d'œufs par gramme de matières fécales (opg) (Raynaud, 1970) et des coprocultures (13 jours, 26 °C) permettant d'obtenir le nombre de larves par gramme (lpg) de matières fécales dans le lot recevant les spores et dans le lot témoin.

1.4.1.2. *Muellerius capillaris*
A partir de prélèvements individuels, on réalise une extraction des larves 1 par la méthode de Baermann. Puis, on place 3 échantillons de matières fécales par chèvre en coproculture, échantillons dont on extraira les larves 1 restantes à 7, 10 ou 14 jours d'incubation.

1.4.2. Impact d'un traitement par le thiabendazole

Afin d'évaluer l'interaction entre le TBZ et *D. flagrans*, nous avons réalisé 2 étapes successives :
- un essai de culture *in vitro* de *D. flagrans* sur gélose Sabouraud en présence de différentes concentrations de TBZ (1, 10, 100 et 200 µg/ml), à température ambiante dans une atmosphère humide pendant une semaine. La concentration de 100 µg/ml correspond, d'après la littérature, à la concentration maximale retrouvée dans les matières fécales après un traitement par le thiabendazole (Prichard *et al*, 1981, Tocco *et al*, 1964).
- un essai *in vivo* par administration du TBZ (NémapanND à 50 mg/kg de poids vif) et des spores aux chèvres infestées par *T. colubriformis* résistant aux BZD suivie de coprocultures individuelles sériées (prélèvements à 0, 24, 36 et 48 h en relation avec la cinétique d'excrétion du TBZ dans les matières fécales) placées dans les mêmes conditions que précédemment.

1.5. ANALYSES STATISTIQUES

Le pourcentage de développement est obtenu par la formule : (nombre de larves par gramme) / (nombre d'œufs par gramme) x 100.

Tableau 1
Nombre d'œufs et de larves par gramme obtenus par coproscopie et coproculture dans les matières fécales des chèvres infestées par *T. circumcincta* ou *T. colubriformis* et recevant ou non les spores de *D. flagrans*

	Nombre moyen d'opg	Nombre moyen de lpg	% de développement
<i>T. colubriformis</i>			
Chèvres recevant les champignons (n=27)	405 ^a	6,28 ¹	1,5
Chèvres témoins (n=26)	384 ^a	62,30 ²	16,2
<i>T. circumcincta</i>			
Chèvres recevant les champignons (n=37)	167 ^a	3 ¹	1,8
Chèvres témoins (n=57)	143 ^a	26 ²	18,2

Par espèce, des lettres ou des chiffres différents dans une même colonne indiquent une différence statistique significative (p<0,01).
n : nombre de mesures.

Les pourcentages de réduction sont obtenus par la formule : ((nombre moyen de lpg du lot témoin/nombre moyen d'opg du lot témoin)*100-(nombre moyen de lpg du lot recevant le champignon/nombre moyen d'opg du lot recevant le champignon)*100)/(nombre moyen de lpg du lot témoin/nombre moyen d'opg du lot témoin). Les données ont été analysées avec le test non paramétrique de Mann-Withney avec le logiciel Systat 9.1 for Windows, 1998, SPSS Inc. (Chicago, Etats-Unis).

2. RÉSULTATS

2.1. ACTIVITÉ DE D. FLAGRANS

2.1.1. Strongles digestifs

Quel que soit le strongle digestif, *T. colubriformis* ou *T. circumcincta*, l'administration de *D. flagrans* par voie orale à des chèvres à la dose de 5*10⁵ spores/kg de poids vif quotidiennement permet de réduire le développement larvaire de 90 % par rapport aux lots témoins en conditions expérimentales (tableau 1).

2.1.2. Muellerius capillaris

Aucune différence dans la survie des larves 1 de *Muellerius capillaris* n'est constatée entre les matières fécales contenant *D. flagrans* et les matières fécales témoins ne le contenant pas pendant les 14 jours d'observation (tableau 2).

Tableau 2
Nombre moyen de larves par gramme de fèces de *M. capillaris* à différentes dates de coproculture

	Jour 0	Jour 7	Jour 10	Jour 14
Lpg dans le lot champignon (n=24)	595 ^{a,A}	194 ^{b,A}	170 ^{b,A}	92 ^{c,A}
Lpg dans le lot témoin (n=24)	507 ^{a,A}	154 ^{b,A}	148 ^{b,A}	98 ^{c,A}

n : nombre de mesures.
(a,b,c) des lettres minuscules différentes dans une même ligne correspondent à une différence statistique entre 2 dates (p<0,05).
(A,B,C) des lettres majuscules différentes dans une même colonne correspondent à une différence statistique entre 2 lots (p<0,05).

2.2. TRAITEMENT PAR LES BENZIMIDAZOLES

2.2.1. Essai in vitro de culture de D. flagrans en présence de TBZ

Les concentrations 10, 100 et 200 µl/ml de gélose de TBZ inhibent totalement la croissance de *D. flagrans*. A 1mg/ml, on observe une croissance significativement ralentie par rapport à la croissance obtenue sur les géloses témoins sans TBZ.

2.2.2. Essai in vivo par administration simultanée de spores et de TBZ à des chèvres (tableau 3)

Le traitement par le TBZ induit une chute de l'excrétion d'œufs qui est maximale, dans les 2 lots, 36 h après le traitement. A 96 h, l'excrétion d'œufs est quasiment revenue à son niveau initial. Le TBZ induit aussi une chute du développement larvaire (réduction de 96 % entre 0 et 24 h dans le lot témoin). Cette réduction du développement larvaire masque un éventuel effet fongicide du TBZ sur *D. flagrans* dans les matières fécales au moment où la concentration de TBZ est maximale dans les fèces c'est-à-dire entre 24 et 36 h d'après Tocco et al, 1964. Avant le traitement et après l'élimination totale du TBZ (à 96 h, les effets du TBZ sur la ponte et le développement ont disparu dans le lot témoin), *D. flagrans* réduit de plus de 93 % le développement larvaire de *T. colubriformis* dans le lot traité.

3. DISCUSSION

A la dose de 5*10⁵ spores/kg de poids vif et par jour, *D. flagrans* réduit de 90 % le développement larvaire des 2 strongles digestifs majeurs des caprins, *Trichostrongylus colubriformis* et *Teladorsagia circumcincta* en conditions expérimentales. A l'inverse, aucun effet n'est constaté sur la survie des larves 1 de *Muellerius capillaris*. Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène serait que les larves 1 ne sont pas suffisamment mobiles pour induire le développement des réseaux contrairement aux larves 3 de strongles digestifs (Nansen et al, 1988). La dose choisie a déjà été utilisée par d'autres auteurs dans d'autres espèces animales et a permis d'obtenir des réductions du même ordre. Ainsi, Fernández et al, 1997, après administration de cette dose à des chevaux constatent une réduction du développement larvaire des strongles variant de 73 à 94 %. Expérimentalement, l'administration individuelle contrôlée des spores a permis d'éviter les variations d'ingestion de la dose entre animaux et d'un jour à l'autre, et par la même les variations d'efficacité. Sur le terrain, si l'administration quotidienne des spores à l'auge est envisageable pour les animaux laitiers, en salle de traite par exemple, elle n'est pas concevable pour des animaux allaitants élevés en permanence au pâturage. Or, il est nécessaire d'administrer quotidiennement les spores pendant 1 ou 2 mois dès la sortie des animaux, sortie qui doit se faire sur des pâtures « propres » car *D. flagrans* n'a pas d'effet sur les larves déjà présentes sur la pâture, pour maintenir de façon efficace un faible niveau de contamination de l'herbe en milieu et en fin de saison. En vue d'une application commerciale, des systèmes à délivrance progressive, logés dans le rumen, tels que ceux mis au point et expérimentés par Waller et al, 2001, permettent de délivrer de manière continue et régulière les spores pendant 25 jours et semblent donc très prometteurs. Le thiabendazole a démontré in vitro une forte activité fongicide. Malgré cela, elle a été impossible à mettre en évidence in vivo. En effet, le marqueur de l'activité de *D. flagrans* est le nombre de lpg dans les matières fécales. Une activité fongicide

Tableau 3
Nombre d'œufs et de larves par gramme de matières fécales de *T. colubriformis* obtenus par coproscopie et coproculture avant et 24, 48 et 96 h après le traitement par du TBZ des chèvres recevant ou non *D. flagrans*

	0 h	24 h	36 h	96 h
Nombre moyen d'opg des chèvres recevant le champignon (n=18)	391 ^{1, a}	197 ^{2, a}	176 ^{2, a}	294 ^{1, a}
Nombre moyen d'opg des chèvres témoins (n=18)	397 ^{1, a}	352 ^{1, b}	155 ^{2, a}	313 ^{1, a}
Nombre moyen de lpg des chèvres recevant le champignon (n=18)	2,62 ^{1, a}	0,11 ^{2, a}	0,17 ^{2, a}	2,76 ^{1, a}
Nombre moyen de lpg des chèvres témoins (n=18)	52,29 ^{1, b}	1,47 ^{2, a}	2,22 ^{3, b}	40,49 ^{1, b}

n : nombre de mesures.
Pour chaque demi-tableau, opg ou lpg, des chiffres différents dans une même ligne indiquent une différence significative dans le même lot entre les dates (p<0,01). Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives entre les lots à une même date (p<0,01).

du thiabendazole dans les fèces aurait dû se traduire par une remontée du nombre de larves par inhibition de la destruction larvaire due au champignon. Or, le thiabendazole a lui-même inhibé très fortement le développement larvaire. Cette inhibition de l'éclosion et du développement nous a été confirmée par un test d'éclosion des œufs en présence de concentrations croissantes de thiabendazole réalisé par D. Kerboeuf (INRA Nouzilly). A la concentration maximale utilisée, 0,7 µg de TBZ/ml de solution, le taux d'éclosion est de 2,9 % pour la souche de *T. colubriformis* résistant aux BZD que nous avons utilisée. Or d'après la littérature (Prichard *et al*, 1981, Tocco *et al*, 1964), on peut estimer la concentration de TBZ dans les fèces après un traitement à 50 mg/kg à environ 100 µg/g de matières fécales. Ceci pourrait expliquer le très faible développement obtenu. L'administration simultanée d'un traitement par les benzimidazoles, quelle que soit leur activité fongicide, et des spores de *D. flagrans* n'entraîne donc pas de remontée du nombre de larves dans les matières fécales et ce en raison de l'inhibition du développement larvaire par ces molécules.

CONCLUSION

Dans l'espèce caprine, cette méthode de contrôle biologique semble très efficace pour réduire le développement larvaire des strongles digestifs. L'absence d'influence sur la survie des larves de *Muellerius capillaris* encourage à explorer la suite du cycle de ce nématode, en particulier pour savoir si des larves qui ont été en contact avec le champignon ont conservé intacte leur capacité à infester leur hôte intermédiaire, un escargot terrestre.

Avant la mise sur le marché de cet agent biologique, il sera nécessaire de :

- rechercher des espèces ou des souches de champignon adaptées à des conditions climatiques différentes ;

- résoudre les problèmes liés au mode d'administration ;
- faire la preuve de l'innocuité du relargage en grande quantité de spores dans le milieu tant pour l'environnement lui-même que pour les consommateurs.

Les auteurs remercient M. Larsen (Danish Centre for Experimental Parasitology, Copenhagen, Danemark) pour ses conseils,

A. Gillespie (Chr Hansen Biosystems A/S, Hørsholm, Danemark) qui nous a fourni les spores et des conseils pour la culture de *D. flagrans*,

A. Silvestre et J. Cabaret (INRA Nouzilly) pour la fourniture des larves,

D. Kerboeuf (INRA Nouzilly) pour la réalisation du test d'éclosion des œufs et ses conseils pour la dilution du TBZ.

Ce travail a été financé grâce au projet européen FAIR QLK5-CT-2001-01843 : " Worm control in organic production systems for small ruminants in Europe : towards the implementation of non-chemical, sustainable approaches " et à une bourse de DEA accordée par l'AFSSA.

Chartier, C., Reche, B., 1992. Vet. Res. Commun., 16, 327-335

Chartier, C., Pors, I., Hubert, J., Rocheteau, D., Benoit, C., Bernard, N., 1998. Small Rum. Res., 19, 33-41

Chartier, C., Soubirac, F., Pors, I., Silvestre, A., Hubert, J., Couquet, C., Cabaret, J., 2001. J. Helminthol., 75, 325-330

Fernández, A.S., Larsen, M., Nansen, P., Grønvold, J., Henriksen, S.A., Wolstrup, J., 1997. Vet. Parasitol., 73, 257-266

Larsen, M., 2000. Parasitology, 120, S121-131

Nansen, P., Grønvold, J., Henriksen, S.A., Wolstrup, J., 1988. Vet. Parasitol., 26, 329-337

Raynaud, J.P., 1970. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 45, 321-342

Prichard, R.K., Steel, J.W., Hennessy, D.R., 1981

J. Vet. Pharm. Ther., 4, 295-304

Tocco, D.J., Buhs, R.P., Brown, H.D., Matzuk, A.R., Mertel, H.E., Harman, R.E., Trenner, N.R., 1964. J. Med. Chem., 7, 399-405

Waller, P.J., Faedo, M., Ellis, K., 2001. Vet. Parasitol., 102, 299-308