

Un premier cas de résistance aux lactones macrocycliques chez les nématodes gastro-intestinaux confirmé en élevage ovin en France

PARAUD C. (1), PORS I. (1), MARCOTTY T. (2), DEVOS J. (3)

(1) Anses Laboratoire de Niort, 60, rue de Pied de Fond, CS 28440, 79024 Niort cedex, France

(2) VERDI-R&D, Sadzot 11, 6997 Erezée, Belgique

(3) Commission Parasitologie de la SNGTV, route de Tarare, 42360 Panissières, France

RESUME - Deux suspicions de résistance à l'ivermectine et à la moxidectine ont été explorées dans deux élevages ovins des départements de la Loire et de l'Allier. Le test de réduction d'excrétion fécale d'œufs de nématodes parasites mis en œuvre dans chacun des troupeaux a permis de confirmer une des suspicions avec des réductions d'excrétion fécale d'œufs suite au traitement de 2 lots d'agnelles, nulle pour l'ivermectine (IC95% : -227/58) et de 13% pour la moxidectine (IC95% : -152/70), par comparaison avec un lot non traité. Après coproculture, la collecte de larves infestantes provenant de cet élevage a permis l'infestation expérimentale de 18 agneaux naïfs (5000 L3/agneau). Les bilans parasitaires réalisés après traitement ont indiqué un pourcentage de réduction égal à 90 % après administration d'ivermectine et de 85 % après administration de moxidectine vis-à-vis des strongles de la caillette (*Teladorsagia circumcincta*) par rapport au lot témoin non traité. Pour les strongles de l'intestin grêle (*Trichostrongylus colubriformis*), le pourcentage de réduction du nombre d'adultes par rapport au lot témoin était égal à 100 % pour l'ivermectine et 99 % pour la moxidectine. Cet essai a permis de décrire la première double résistance de strongles gastro-intestinaux vis-à-vis de l'ivermectine et de la moxidectine dans un troupeau ovin français.

First description of strongyle resistance to macrocyclic lactones in a sheep flock in France

PARAUD C. (1), PORS I. (1), MARCOTTY T. (2), DEVOS J. (3)

(1) Anses laboratoire de Niort, 60 rue de Pied de Fond, CS 28440, 79024 Niort cedex, France

SUMMARY- Two suspicions of strongyle resistance to macrocyclic lactones were explored in two sheep flocks in the Center of France. A faecal egg count reduction test was set up in the two flocks and one suspicion was confirmed with mean percentage of reduction in the treated groups of 0 % for ivermectin (CI 95%:-228/58) and 13 % for moxidectin (CI 95%:-152/70). Thereafter, an experimental infection of 18 naïve lambs was set up using infective larvae isolated from this flock (5000 L3/lamb). Abomasal worm burdens (*Teladorsagia circumcincta*) were reduced by 90% and 85% after ivermectin and moxidectin treatment, respectively. For intestinal strongyles (*Trichostrongylus colubriformis*), the reduction values reached 100% and 99% for ivermectin and moxidectin, respectively. This trial demonstrated the first multiple resistance in ovine strongyles in France.

INTRODUCTION

La résistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques (AHs) chez les petits ruminants est décrite depuis de nombreuses années. Ce phénomène inéluctable survient généralement une dizaine d'années après la commercialisation du médicament considéré (Waller, 2006). Cette résistance est génétique, les individus porteurs des gènes de résistance sont sélectionnés par la pression de sélection liée à l'emploi des traitements. Elle est héréditaire d'une génération parasitaire à l'autre et irréversible même en l'absence d'utilisation de la molécule. Toutes les familles sont potentiellement concernées et l'acquisition de résistances à l'ensemble des familles menace l'élevage au pâturage dans certaines zones du globe. En France, une enquête transversale récente a confirmé la forte prévalence des résistances aux benzimidazoles dans les élevages ovins laitiers mais n'a identifié aucun cas de résistance vis-à-vis de la moxidectine et de l'ivermectine (Geurden *et al*, 2014). L'essai présenté ici rapporte l'exploration de deux suspicions de résistance aux AHs émises par des vétérinaires dans des troupeaux ovins de la Loire et de l'Allier.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ELEVAGES ET ANIMAUX

L'élevage A est constitué d'un troupeau de 420 brebis de race Ile de France. Les seuls animaux introduits sont les nouveaux béliers, sans vermifugation à l'introduction. Le chargement est de 10 brebis/ha. Les brebis pâturent

généralement d'avril à novembre. La rotation, après 1 à 2 semaines, n'est pratiquée que sur la moitié des terrains, pâturés essentiellement par les adultes. Les agneaux sont traités, toutes les 5 à 8 semaines, depuis 1995, avec de la moxidectine buvable. La décision de traiter est prise dès l'apparition de diarrhée. Les adultes sont traités à la moxidectine buvable en juin et à la rentrée à l'étable, à la moxidectine ou ivermectine injectable au retour d'estive (risques de contamination par la gale). La résistance aux benzimidazoles a été confirmée dans cet élevage en 1995.

L'élevage B est constitué d'un troupeau de 700 brebis également de race Ile de France. Les achats se limitent aux béliers. Ils sont vermifugés à l'introduction au lévamisole jusqu'en 2009, à la moxidectine depuis. Les animaux pâturent toute l'année. Aucune rotation n'est pratiquée. Les agneaux sont traités systématiquement à l'âge de 30 jours avec un benzimidazole et à 60 jours au lévamisole jusqu'en 2003 et à la moxidectine depuis. Les adultes sont traités 4 fois par an en alternant de l'oxfendazole et du lévamisole jusqu'en 2003. Soupçonnant une résistance à l'oxfendazole, l'éleveur a remplacé ce produit par l'ivermectine jusqu'en 2006 puis par la moxidectine, toujours en alternance avec le lévamisole.

1.2. TEST DE REDUCTION D'EXCRETION FECALE (FECRT)

Dans chacun des troupeaux, préalablement au FECRT, l'excrétion d'œufs a été suivie dans les lots d'agnelles, par des prélèvements de matières fécales de mélange, par une méthode modifiée de McMaster (Raynaud, 1970).

Lorsque l'excrétion moyenne a dépassé 150 œufs par gramme de matières fécales (opg), 45 agnelles de chaque troupeau ont été sélectionnées et réparties en 3 lots de 15 animaux chacun : lot 1 : témoins, lot 2 : lot traité par l'ivermectine à la dose recommandée par l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) (0,2 mg/kg PV, voie orale (Oramec®, Merial, France)), lot 3 : lot traité par la moxidectine à la dose de l'AMM (0,2 mg/kg PV, voie orale (Cydecine®, Fort Dodge Santé Animale, France)).

Chaque agnelle a été pesée et traitée à la dose exacte. Des prélèvements individuels de matières fécales ont été réalisés le jour du traitement (J0) et 16 jours après (J16). Les prélèvements ont été analysés par la même méthode modifiée de McMaster avec une sensibilité de 50 opg. Des coprocultures de groupe (12 jours à 20°C) ont été mises en place afin d'identifier les espèces parasitaires présentes (MAAF, 1986).

Les moyennes géométriques d'excrétion fécale ont été calculées à l'aide d'une régression binomiale négative. Les pourcentages de réduction d'excrétion fécale dans chacun des lots traités par rapport au lot témoin au sein du même élevage ont été calculés par la formule de Presidente (1985) : $REF = 100 \times (1 - [T2/T1][C1/C2])$, T1 et T2 correspondant à l'excrétion d'œufs moyenne dans les lots traités à J0 et à J16 respectivement, C1 et C2 correspondant à l'excrétion d'œufs moyenne dans les lots témoins à J0 et à J16 respectivement. L'intervalle de confiance (IC) a été calculé par la combinaison non-linéaire des estimateurs de la régression binomiale négative.

La comparaison de l'excrétion d'œufs avant et après traitement a été réalisée avec le logiciel Systat 9.1 for Windows 1998 (SPSS Inc., Chicago, Etats-Unis) par le test non paramétrique de Mann-Whitney avec un degré de signification $p < 0,05$. L'analyse des pourcentages de réduction a été réalisée avec le logiciel Stata 10 (StataCorp, College Station, Etats-Unis).

Les résultats ont été interprétés suivant les recommandations de la WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) (Coles *et al*, 2006).

1.3. INFESTATION EXPERIMENTALE

Une infestation expérimentale a été réalisée lorsque les résultats du FECRT indiquaient la présence de résistance. Dix-huit agneaux de 2 mois, naïfs vis-à-vis des strongles intestinaux, ont été infestés par 5000 larves infestantes/agneau issues de l'élevage suspect. L'excrétion fécale d'œufs a été suivie par des analyses individuelles par coproscopie en lames de McMaster à partir de 28 jours post-infestation.

Lorsque que l'infestation a été patente, les agneaux ont été répartis en 3 lots de 6 animaux, identiques en moyenne pour le poids vif et l'excrétion d'œufs et traités à la dose de l'AMM (35 jours post-infestation) : lot 1 : témoins, lot 2 : lot traité par l'ivermectine (0,2 mg/kg PV, voie orale), lot 3 : lot traité par la moxidectine (0,2 mg/kg PV, voie orale).

Tous les agneaux ont été sacrifiés 10 jours après le traitement et des bilans parasitaires (comptage et identification des parasites adultes présents par organe sur des aliquotes de 1/10^{ème} du volume total de lavage) ont été réalisés.

L'efficacité du traitement a été évaluée par la formule suivante : $([C-T]/C) \times 100$, où C est la moyenne géométrique du nombre d'adultes dans le lot témoin et T est la moyenne géométrique du nombre d'adultes dans chacun des lots traités (Mejía *et al*, 2003). L'IC a été calculé par la combinaison non-linéaire des estimateurs de la régression binomiale négative.

La comparaison du nombre de parasites adultes entre les lots traités et le lot témoin a été réalisée avec le logiciel Systat 9.1 par le test non paramétrique de Mann-Whitney avec un degré de signification $p < 0,05$.

Ce protocole d'infestation expérimentale a été examiné par le comité d'éthique n°16 et n'a provoqué ni douleur ni stress chez les agneaux.

3. RESULTATS

3.1. TEST DE REDUCTION D'EXCRETION FECALE (tableau 1)

Dans l'élevage A, avant traitement, l'excrétion fécale d'œufs moyenne est identique entre les 3 lots ($p=0,8$). Dans le lot témoin, l'excrétion moyenne a diminué de façon significative entre J0 (325 opg) et J16 (118 opg) ($p < 0,05$). Dans le lot 2, la réduction d'excrétion fécale estimée est négative (-17, IC95% [-227 ; 58]), ce qui traduit une absence de réduction d'excrétion d'œufs due au traitement, voire une augmentation d'excrétion, par rapport à la réduction d'excrétion « naturellement » observée dans le lot témoin. Après traitement par la moxidectine, la réduction d'excrétion fécale calculée est de 13% (IC95% [-152 ; 70]). La coproculture a permis d'identifier les genres *Trichostrongylus/Teladorsagia* (88%) et *Oesophagostomum/Chabertia* (12%) avant traitement. Les coprocultures post-traitement ont révélé la seule présence des genres *Trichostrongylus/Teladorsagia* dans les lots 2 et 3. Le FECRT permet d'émettre une forte suspicion de double résistance à l'ivermectine et à la moxidectine dans cet élevage.

Dans l'élevage B, avant traitement, l'excrétion fécale d'œufs moyenne était différente entre les 3 lots ($p=0,04$). Dans le lot témoin, l'excrétion d'œufs est restée stable entre J0 et J16 ($p=0,6$). Dans le lot 2, la réduction d'excrétion fécale calculée est de 96%, dans le lot 3, elle s'élève à 98%. La coproculture pré-traitement a montré la présence des genres *Trichostrongylus/Teladorsagia* (91%) et *Oesophagostomum/Chabertia* (9%). Après traitement, seuls les genres *Trichostrongylus/Teladorsagia* ont été identifiés dans le lot 2.

Tableau 1 : Excrétion fécale moyenne (SD) à J0 et à J16 dans les 3 lots d'agnelles (n=15 agnelles/lot): lot 1 : lot témoin, non traité, lot 2 : ivermectine, lot 3 : moxidectine dans chacun des élevages et pourcentage de réduction [IC 95%]

		Elevage A	Elevage B
Lot 1	Excrétion fécale moyenne (SD) à J0 (opg)	350 (326)	271 (282)
	Excrétion fécale moyenne (SD) à J16 (opg)	118 (128)	347 (400)
Lot 2	Excrétion fécale moyenne (SD) à J0 (opg)	430 (336)	430 (183)
	Excrétion fécale moyenne (SD) J16 (opg)	250 (331)	30 (90)
	% de réduction [IC 95%]	-17 [-227 ; 58]	96 [84 ; 98]
Lot 3	Excrétion fécale moyenne (SD) à J0 (opg)	367 (291)	300 (159)
	Excrétion fécale moyenne (SD) J16 (opg)	143 (248)	0 (0)
	% de réduction [IC 95%]	13 [-152 ; 70]	98 [86 ; 100]

3.2. INFESTATION EXPERIMENTALE

Une infestation expérimentale a été réalisée à partir des larves infestantes issues d'une coproculture de masse à partir des matières fécales des agnelles de l'élevage A. L'absence d'infestation préalable a été vérifiée avant l'infestation expérimentale. Trente-deux jours post-infestation,

avant le traitement anthelminthique, l'excrétion moyenne par lot variait de 383 à 400 opg et les poids individuels de 14 à 34 kgs.

Le jour du bilan parasitaire, soit 10 jours post-traitement, tous les agneaux du lot témoin excrétaient des œufs de strongles (excrétion moyenne : 440 opg) alors que seuls 2 agneaux dans chacun des lots traités étaient retrouvés positifs à la coproscopie (excrétion : 50 opg).

Les charges parasitaires moyennes par lot sont présentées dans le tableau 2. Dans le lot témoin (lot 1), les parasites de l'intestin grêle, *Trichostrongylus colubriformis*, représentent 63% de la charge parasitaire totale (en moyenne, 1088 adultes), suivis par les parasites de la caillette, *Teladorsagia circumcincta* (en moyenne, 578 adultes). Tous les agneaux étaient aussi infestés par *Oesophagostomum venulosum*. Dans le lot traité par l'ivermectine (lot 2), la totalité des adultes présents ont été retrouvés dans l'abomasum (100% des agneaux étaient encore infestés) et appartenaient à l'espèce *T. circumcincta*. Les adultes des espèces *T.*

colubriformis et *O. venulosum* ont été totalement éliminés. Dans le lot traité par la moxidectine (lot 3), l'essentiel de la charge parasitaire est représenté de nouveau par des adultes de *T. circumcincta* (91% de la charge moyenne avec 100% des agneaux infestés), avec toutefois la présence résiduelle de quelques adultes de *T. colubriformis* dans l'intestin grêle (3 agneaux infestés/6, charges parasitaires variant de 10 à 30 adultes).

Les charges parasitaires totales des lots traités sont significativement différentes de celles du lot témoin ($p < 0,05$). La réduction moyenne du nombre total d'adultes est de 94,6% et 96,7% dans les lots traités par l'ivermectine et la moxidectine, respectivement par rapport à la charge parasitaire globale du lot témoin. Les réductions les plus faibles sont obtenues pour les 2 anthelminthiques vis-à-vis des parasites de la caillette de l'espèce *T. circumcincta* (90,2 et 85,3%, pour l'ivermectine et la moxidectine respectivement).

Tableau 2 : Charges parasitaires moyennes par organe et par lot (n=6 agneaux/lot), pourcentage de réduction de la charge parasitaire dans les lots traités (lot 2 : ivermectine, lot 3 : moxidectine) par rapport au lot témoin (lot 1) et par espèce parasitaire identifiée

		Charge parasitaire moyenne (min-max)	% réduction (IC 95%)	Espèces présentes
Abomasum	Lot 1	578 (220-670)	-	<i>T. circumcincta</i>
	Lot 2	57 (10-110)	90,2 [81,5-94,8]	<i>T. circumcincta</i>
	Lot 3	85 (30-200)	85,3 [72,4-92,2]	<i>T. circumcincta</i>
Intestin grêle	Lot 1	1088 (770-1430)	-	<i>T. colubriformis</i>
	Lot 2	0	100	-
	Lot 3	8 (0-30)	99,2 [97,5-99,8]	<i>T. colubriformis</i>
Caecum	Lot 1	60 (12-118)	-	<i>O. venulosum</i>
	Lot 2	0	100	-
	Lot 3	0	100	-
Total	Lot 1	1727 (1272-2268)	-	-
	Lot 2	57 (10-110)	94,6 [90,5-96,9]	-
	Lot 3	93 (40-200)	96,7 [94,2-98,1]	-

3. DISCUSSION

Ce travail décrit le premier cas confirmé de résistance aux lactones macrocycliques dans un élevage ovin en France. Cette double résistance est portée par des parasites du genre *Teladorsagia circumcincta*. Cette espèce est impliquée dans des cas de résistance à l'ivermectine en Italie (Traversa *et al*, 2007) et en Espagne (Martínez-Valladeres *et al*, 2012). A l'inverse, seuls Sargison *et al* (2010) décrivent des résistances dues à *T. circumcincta* vis-à-vis de la moxidectine au Royaume-Uni, dans des circonstances de multi-résistance.

Le FECRT ne permet qu'une détection tardive de la résistance puisqu'il ne la détecte que lorsque 25% des parasites adultes sont porteurs des gènes de résistance (Martin *et al*, 1989).

La confirmation d'une suspicion émise suite à un FECRT par infestation expérimentale d'animaux est indispensable comme en témoignent des essais dans lesquels une suspicion de résistance émise suite au FECRT a été infirmée lors de l'infestation expérimentale (Paraud *et al*, 2013; Areskog *et al*, 2014). Dans le présent essai, le traitement suite à l'infestation expérimentale conduit à une réduction du nombre d'adultes supérieure à 90% lorsqu'on considère les charges parasitaires totales alors que le FECRT mettait en évidence une quasi-absence de réduction d'excrétion. Le fait que les animaux impliqués étaient très différents peut expliquer cet écart : pour le FECRT, nous avons travaillé avec des agnelles d'environ 1 an qui avaient déjà pâture précédemment et d'un poids moyen de 64 kgs alors que pour l'infestation expérimentale, des agneaux de 2 mois, juste sevrés, naîfs au point de vue parasitaire et d'un poids moyen de 24 kgs ont été utilisés. Or l'âge, l'état corporel et le statut

pathophysiologique sont des facteurs de variation de la pharmacocinétique des lactones macrocycliques et donc de leur efficacité (González-Canga *et al*, 2009).

A l'heure actuelle, le seul test de détection en ferme validé est le FECRT. Plusieurs tests phénotypiques réalisables *in vitro* existent et sont en cours de standardisation (Demeler *et al*, 2010 et 2013). Des méthodes moléculaires de détection des gènes de résistances existent pour la résistance aux benzimidazoles ou sont en cours de mise au point pour la résistance à l'ivermectine (Urdaneta-Marquez *et al*, 2013). Ces tests devront être confrontés à l'expression phénotypique de la résistance avant d'avoir une application concrète sur le terrain (Barrère *et al*, 2013).

CONCLUSION

Cet essai illustre la démarche classique de confirmation d'une suspicion de résistance aux AHs en fermes par des méthodes expérimentales rigoureuses. Il en démontre la complexité. Il apparaît nécessaire de valider des tests de diagnostic de la résistance aux AHs plus simples et plus rapides pour généraliser la surveillance de leur apparition ou diffusion. Cette surveillance permettra d'alerter les utilisateurs, afin de modifier les usages générateurs de résistance et ainsi de préserver l'efficacité des anthelminthiques afin de pérenniser l'élevage de ruminants au pâturage.

Les auteurs remercient le Dr Madet qui a conduit un des tests de réduction d'excrétion fécale. Les interventions des Drs Madet et Devos ont reçu le soutien financier de la SNGTV. Cet essai a bénéficié du soutien financier de la région Poitou-Charentes.

Areskog, M., Sollenberg, S., Engström, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Höglund, J., 2014. Parasites and Vectors, 7, 13.

Barrère, V., Keller, K., von Samson-Himmelstjerna, G., Prichard, R.K., 2013. Parasitol. Int., 62, 464-470.

Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. Vet. Parasitol., 136, 167-185.

Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruyse, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2010. Vet. Parasitol., 174, 58-64.

Demeler, J., Gill, J.H., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2013. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist., 3, 109-118.

Geurden, T., Hoste, H., Jacquiet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., di Regalbono, A.F., Tzanidakis, N., Kostopoulou, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., Noé, L., Vanimisetti, B., Bartram, D. 2014. Vet. Parasitol., 201, 59-66.

González-Canga, A., Sahagún Prieto, A.M., Diez Liébana, M.J., Fernández Martínez, N., Sierra Vega, M., García Vieitez, J.J., 2009. Vet. J., 179, 25-37.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAAF), 1986. HMSO, London, 160 pp.

Martin, P.J., Anderson, N., Jarrett, R.G., 1989. Austr. Vet. J., 66, 236-240.

Martínez-Valladeres, M., Famularo, M.R., Fernández-Pato, N., Cordero-Pérez, C., Castañón-Ordóñez, L., Rojo-Vázquez, F.A. 2012. Parasitol. Res., 110, 2083-2087.

Mejía, M., Fernández Igartúa, B.M., Schmidt, E., Cabaret, J., 2003. Vet. Res., 34, 461-467.

Paraud, C., Chartier, C., Devos, J., 2013. Bull. GTV, 70, 97-103.

Presidente, P.J.A., 1985. In: Anderson, N., Waller, P.J. (Eds.), Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs. CSIRO division of Animal Health, Glebe, NSW, Australia, pp. 13-28.

Raynaud, J.P., 1970. Ann. Parasit. Hum. Comp., 45, 312-342.

Sargison, N.D., Scott, P.R., Wilson, D.J., Macrae, A.I., Penny, C.D., 2010. Vet. Rec., 167, 523-527.

Traversa, D., Paoletti, B., Otranto, D., Miller, J., 2007. Parasitol. Res., 101, 1713-1716.

Urdaneta-Marquez, L., Dent, J., Janukavicius, P., Beech, R., Prichard, R., 2013. 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 25-29 août 2013, Perth, Australie, 395.

Waller, P.J., 2006. Vet. Parasitol. 139, 1-14.