

Sélection sur phénotypes de la résistance aux strongles gastro-intestinaux en centre d'élevage de béliers.

JACQUIET P.¹, FIDELLE F.², GRISEZ C.¹, PREVOT F.¹, LIENARD E.¹, BERGEAUD J.P.¹, SICARD S.¹, BARILLET F.³, ASTRUC J.M.⁴

1. UMT « Maîtrise de la Santé des Troupeaux de Petits Ruminants », INRA, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, BP 87 614, 31 076 Toulouse cedex 03

2. Centre Départemental de l'Élevage Ovin d'Ordiarp, 64 130, Ordiarp

3. UMT « Amélioration Génétique des Petits Ruminants », UR 631 INRA SAGA, 31 321 Castanet-Tolosan cedex

4. UMT « Amélioration Génétique des Petits Ruminants », Institut de l'Élevage, 31 321 Castanet-Tolosan cedex

Résumé

Les strongyloses gastro-intestinales occasionnent des pertes de production laitière et de la mortalité chez les petits ruminants laitiers. Les ovins laitiers de races Manech Tête Rousse (MTR), Manech Tête Noire (MTN) et Basco-Béarnaise (BB) sont soumis à de fortes pressions parasitaires car les conditions climatiques des Pyrénées Atlantiques sont très favorables à ces parasites. L'utilisation exclusive des Benzimidazoles (seuls anthelminthiques autorisés en lactation chez la brebis) a conduit à l'apparition de résistance dans les populations de strongles d'où la nécessité de proposer des méthodes alternatives aux traitements chimiques. La sélection génétique d'animaux résistants aux parasites est une approche prometteuse, le regroupement de béliers dans des centres d'élevage offrant l'opportunité d'effectuer cette sélection sur les futurs mâles d'insémination artificielle. Cet article fait le point sur la sélection sur phénotypes chez des béliers du Centre Ovin d'Ordiarp.

Les jeunes béliers d'Ordiarp n'étant pas élevés au pâturage, des infestations expérimentales avec le nématode hématophage *Haemonchus contortus* ont été réalisées. Une première année a permis de tester différents protocoles d'épreuve et d'évaluer l'impact des infestations sur leurs paramètres hématologiques. L'intensité d'excrétion d'œufs par gramme de fèces (OPG) et l'hématocrite ont été mesurés. La seconde année a consisté à éprouver tous les béliers MTR, MTN et BB d'un même millésime avec le protocole retenu.

Ce protocole consiste en deux infestations expérimentales uniques, successives, interrompues par un traitement au bout de 30 jours et séparées de quinze jours. L'infestation des béliers lors de la seconde année a permis de générer une grande variabilité individuelle des excréments d'œufs dans les trois races en première infestation : 1120 +/- 700 (MTR, N = 103), 960 +/- 920 (MTN, N = 37), 550 +/- 590 (BB, N = 36) comme en seconde infestation : 970 +/- 825 (MTR), 800 +/- 740 (MTN), 990 +/- 1400 (BB). L'impact sur l'hématocrite était minime (pertes de 3 à 6% seulement selon les races).

Une sélection sur phénotypes de la résistance aux strongles gastro-intestinaux semble réalisable en centre de béliers. L'effet de cette sélection sur les performances des filles de béliers doit toutefois être vérifié en conditions naturelles d'infestation.

Phenotypic selection of rams for resistance to gastrointestinal strongyles in breeding centres.

JACQUIET P., FIDELLE F., GRISEZ C., PREVOT F., LIENARD E., BERGEAUD J.P., SICARD S., BARILLET F., ASTRUC J.M.

1 UMT « Maîtrise de la Santé des Troupeaux de Petits Ruminants », INRA, ENVT, BP 87 614, 31 076 Toulouse

Summary

Selective breeding of animals resistant to gastrointestinal strongyles (GIS) is one of the possible answers to increasing anthelmintic resistance (AR) in sheep farming. In the French Atlantic Pyrenees, the dairy sheep industry is facing more and more AR due to the exclusive use of benzimidazoles during the lactating period, the high concentration of sheep farms and the highly favourable climatic conditions to the parasitic life cycle in this region. Indeed, the ram breeding centre, "Centre Ovin d'Ordiarp", decided to implement a phenotypic selection of resistant animals. A protocol consisting of two successive experimental infections with the blood-sucking nematode, *Haemonchus contortus* was tested in two phases. A limited subset of rams was infected during the first phase of the study in which two experimental doses were tested. A high individual variability of egg excretions was observed, however, the effects of these infections on the haematological parameters of rams were considered too severe, especially during the first infection. In consequence, a smaller dose was proposed in the first infection. All rams, two or three years old, belonging to three breeds (Manech Tête Rousse, Manech Tête Noire and Basco-Béarnaise) were challenged during the second phase of the study. This time, high individual variability was obtained without any significant effect on packed cell volumes of the animals. This study demonstrated that a phenotypic selection of resistant animals to GIS is feasible in ram centres.

Introduction

Les strongyloses gastro-intestinales constituent une contrainte majeure de l'élevage des petits ruminants à l'herbe par les pertes de production et la mortalité qu'ils occasionnent. Le contrôle de ces parasitoses a longtemps reposé sur l'emploi de molécules chimiques à propriété anthelminthique. Toutefois, l'utilisation répétée de ces molécules a entraîné l'apparition rapide de résistance à ces produits chez les parasites (Wolstenholme et al., 2004). Pour faire face à cette situation, plusieurs méthodes complémentaires à l'emploi de molécules chimiques font l'objet de recherches actuellement. Il ne s'agit pas de se passer des anthelminthiques dans le futur mais bien de les utiliser de façon rationnelle en complément avec des méthodes non chimiques. Celles-ci se déclinent en trois groupes : i) la diminution de la contamination des pâtures par la mise au repos des parcelles, ii) l'élimination des strongles gastro-intestinaux par des plantes à tannins ou autres traitements alternatifs et iii) l'augmentation de la résistance de l'hôte obtenue soit par la vaccination, la supplémentation en protéines ou bien la sélection d'animaux résistants aux parasites (Getachew et al., 2007).

C'est ce tout dernier point qui est développé dans cet article. On définit la résistance d'un animal comme sa capacité à réduire l'installation, le développement, la fécondité et la survie des parasites. On parlera de résilience quand un animal parvient à maintenir son niveau de production en dépit des infestations par les parasites. Les variations de résistance des ovins aux strongles gastro-intestinaux s'observent entre races mais aussi entre individus d'une même race (Bishop et Morris, 2007). Une partie de la variation de résistance des ovins a une origine génétique. L'identification et la sélection des individus génétiquement résistants au sein d'une population peuvent être réalisées à partir d'un phénotype ou bien à partir de marqueurs génétiques.

Dans l'immédiat, seule la sélection sur phénotypes d'ovins résistants aux strongles gastro-intestinaux est envisageable. Les objectifs de cet article sont i) de discuter la pertinence de différents phénotypes associés à la résistance à ces parasites, ii) de définir les populations cibles de cette sélection et les moyens d'obtenir ces phénotypes dans le contexte français d'amélioration génétique des petits ruminants, enfin iii) de présenter un exemple concret de mise en œuvre d'une sélection sur phénotype dans les races ovines laitières des Pyrénées Atlantiques.

1. PHENOTYPES ASSOCIES A LA RESISTANCE DE L'HOTE.

Quatre espèces de strongles gastro-intestinaux sont considérées comme majeures chez le mouton en raison de leur fréquence et de leur pouvoir pathogène : *Haemonchus contortus* et *Teladorsagia circumcincta* localisés dans la caillette (le premier est hématophage) et *Trichostrongylus colubriformis* et *Cooperia curticei* dans l'intestin grêle. A cette diversité spécifique répond une relative homogénéité des cycles biologiques : les vers femelles pondent des oeufs qui se retrouvent dans les matières fécales puis vont évoluer en larves infestantes sur la pâture.

Une fois ingérée, la L3 gagne l'organe électif (caillette ou intestin grêle) pour y muer en larve de quatrième stade (L4) puis en ver adulte. La résistance de l'hôte peut s'exercer à chacune de ces étapes du développement du parasite ; de nombreux mécanismes immunitaires interviennent tout au long de ce processus. Sans considérer la nature exacte de

ces mécanismes, de leur importance relative et de leur succession dans le temps, le phénomène de résistance se traduit phénotypiquement par une réduction du nombre d'oeufs du parasite dans les matières fécales. L'intensité d'excrétion d'oeufs dans les matières fécales est par conséquent le phénotype le plus couramment utilisé pour évaluer la résistance d'un individu (Beh et Maddox, 1996).

Ce caractère, complexe, doit être compris comme la résultante du nombre de parasites adultes présents et de la fécondité *per capita* des vers femelles au moment de la mesure. Cette fécondité dépend de nombreux facteurs (espèce de parasite, état immunitaire de l'animal...). La relation entre nombre de vers et intensité d'excrétion d'oeufs dans les matières fécales est excellente quand l'espèce *H. contortus* domine dans la communauté d'espèces (Cabaret et al., 1998). L'héritabilité de l'intensité d'excrétion d'oeufs varie entre 0,2 et 0,4 selon les études (Douch et al., 1996 ; Bouix et al., 1998). La mesure de l'excrétion d'oeufs est simple mais elle prend du temps, même pour un opérateur chevronné, ce qui limite considérablement son emploi sur de très grands effectifs. En dépit d'efforts considérables, elle n'est toujours pas automatisable. Son coût unitaire varie de 8 à 12 euros selon les laboratoires. La mesure de taux d'anticorps spécifiques est un autre phénotype étudié (Beh et Maddox, 1996). La quantité d'immunoglobulines G spécifiques des antigènes de L3 de *T. colubriformis* et d'*H. contortus* dans le sang est négativement corrélée à l'intensité d'excrétion d'oeufs (Douch et al., 1996). L'héritabilité de ce caractère est faible (0,08 à 0,18) à six mois d'âge mais bien meilleure (0,29 à 0,43) quand l'animal a été en contact toute une saison de pâturage avec les larves infestantes. En Nouvelle Zélande, le Hopkirk Research Institute commercialise depuis peu un test d'évaluation du taux d'anticorps dans la salive des animaux. Les anticorps dirigés contre les antigènes CarLA (Carbohydrate Larval Antigens) de la cuticule des larves sont présents en grande quantité dans le mucus des muqueuses digestives des ovins immunisés contre les strongles gastro-intestinaux (Harrison et al., 2008).

L'intensité de cette réponse anticorps locale est négativement corrélée à l'intensité d'excrétion d'oeufs et elle est héritable ($h^2 = 0,3$). Dans la pratique, après six à huit mois d'exposition sur la pâture, un prélèvement de salive est effectué sur lequel sont quantifiés les anticorps anti-CarLA. Cela permet d'évaluer le statut résistant ou sensible des animaux. En bilan, les outils phénotypiques existent pour évaluer la résistance des individus. Comment les utiliser dans un schéma de sélection est l'objet de la seconde partie.

2. APPLICATION DES OUTILS PHENOTYPIQUES DANS DES SCHEMAS DE SELECTION

2.1. Quelle population cible ?

Etablir des phénotypes de résistance aux strongles gastro-intestinaux chez toutes les femelles d'un noyau de sélection ou sur toutes les filles de testage des béliers d'insémination artificielle (IA) n'est pas envisageable pour une raison de coût. Reste donc la possibilité d'établir les phénotypes sur ces béliers eux-mêmes. Leur regroupement en centres d'élevage dans le système français d'amélioration génétique facilite cette approche. L'évaluation génétique des futurs béliers (IA ou monte naturelle) par des mesures individuelles de phénotypes de résistance aux strongles gastro-intestinaux devrait permettre à terme d'intégrer ce caractère de résistance dans un index de synthèse ovin.

2.2. Comment obtenir un phénotype résistant en centre de béliers ?

L'obtention d'un phénotype associé à la résistance nécessite l'exposition des béliers aux parasites. Or, dans la plupart des centres de béliers (centres d'élevage, stations de contrôle individuel, centres d'IA), les animaux sont élevés à l'intérieur de bâtiments, sans possibilité d'infestations naturelles. Il faut donc recourir à des infestations expérimentales. Le choix de l'espèce de parasite à inoculer s'est porté sur *H. contortus* car cette espèce induit précocement des réponses immunitaires chez l'animal (Lacroux et al., 2006) et discrimine rapidement des individus résistants (R) et sensibles (S). Sélectionner sur la résistance à *H. contortus* permet de sélectionner dans le même temps la résistance aux autres espèces de strongles gastro-intestinaux du mouton comme en témoignent les valeurs élevées de corrélations génétiques entre résistances aux différentes espèces (0,7 pour Bishop et Morris, 2007 ; 0,9 pour Gruner et al., 2004a).

De plus, la corrélation génétique entre les excréments mesurés après infestations naturelles et les infestations expérimentales est très forte (0,87) ce qui laisse supposer que ces deux types d'infestation mobilisent le même potentiel génétique chez les animaux (Gruner et al., 2004b). *H. contortus* étant un parasite hématophage, le protocole d'épreuve des béliers doit permettre une exposition suffisante des animaux aux parasites pour induire l'expression de leur résistance (ou de leur sensibilité) sans (trop) les pénaliser. Ce protocole sera adapté à chaque schéma de sélection. La partie suivante illustre la mise au point d'un protocole dans les races ovines laitières des Pyrénées Atlantiques.

2.3. Un exemple de mise en place d'une sélection sur phénotypes dans les races ovines laitières des Pyrénées Atlantiques

Les conditions climatiques des Pyrénées Atlantiques sont très favorables au cycle biologique des strongles gastro-intestinaux des ovins (Jacquet et al., 2004), d'où des traitements répétés et un haut niveau de résistance aux anthelminthiques. Le centre ovin d'Ordiarp, qui regroupe les béliers d'IA des trois races laitières des Pyrénées, Manech Tête Rousse (MTR), Manech Tête Noire (MTR) et Basco-Béarnaise (BB), s'est donc intéressé à cette nouvelle approche du contrôle de ces parasites. Les jeunes béliers entrent au centre à l'âge de 2-3 mois, sont mis en testage à 8 mois ou à 1,5 an et les premières IA de diffusion sont faites à 2,5 ans. L'exposition des béliers aux parasites ne peut couvrir qu'une période de trois ou quatre mois située entre la fin du testage et au moins six mois avant les premières IA de diffusion. Par précaution, l'infestation parasitaire doit être terminée depuis plusieurs mois avant le début de la collecte de semence. Si cette période de trois ou quatre mois d'exposition au parasite n'est pas suffisante pour mesurer une réponse anticorps, elle l'est en revanche pour estimer l'intensité d'excrétion d'œufs lors d'infestations expérimentales (Lacroux et al., 2006). En accord avec les responsables du Centre Ovin d'Ordiarp, une étude de faisabilité a été réalisée en deux phases : la première année (automne 2008) a permis de tester deux niveaux d'infestation (5000 et 7500 L3) sur un petit groupe de béliers MTR de deux et trois ans. Un groupe de béliers de même âge mais non infestés a permis de mesurer l'impact des infestations sur les paramètres hématologiques. Les intensités d'excrétion d'œufs sont mesurées à la fin de deux infestations successives de trente jours chacune, séparées par une période sans

infestation de 15 jours. Chacune des deux infestations est stoppée par un traitement avec de l'ivermectine orale (Oramec ND). L'efficacité du traitement est vérifiée quinze jours après le traitement. Les paramètres hématologiques sont comparés avant et trente jours après chaque infestation. Si une variabilité individuelle importante dans les excréments d'œufs a bien été obtenue lors de la première année (Tableau 1), une baisse importante de l'hématocrite a été constatée en première infestation (pas en seconde infestation).

Tableau 1 : Résultats d'intensité d'excrétion d'œufs (Œufs Par Gramme ou OPG) et de variation d'hématocrite (Δ Ht) obtenus au cours de la première année (**Moyennes, écart-types**).

Groupe de béliers MTR	N	Infestation 1		Infestation 2	
		OPG1	Δ Ht (J0-J30)	OPG2	Δ Ht (J45-J75)
5000 L3	31	3850 (2311)	- 19,5%	2330 (2054)	+ 6%
7500 L3	20	2830 (1770)	- 19%	1230 (1175)	- 0,05%
Témoins	30	0	+ 3%	0	- 1,5%

Il a donc été décidé, pour les infestations de l'année 2 (automne 2009), de diminuer le nombre de larves inoculées en première infestation (3500 L3) mais de conserver le nombre de 5000 pour la seconde. En seconde année, les 3 races ont été concernées. Des niveaux comparables de variabilités individuelles ont été générés sans que l'hématocrite des animaux soit significativement affecté en première et en seconde infestation (Tableau 2). La production de semence des béliers infestés, six mois après la fin de la dernière infestation, s'est révélée comparable (en quantité et en qualité) avec celle des béliers témoins (source CDEO Ordiarp).

Tableau 2 : Résultats d'intensité d'excrétion d'œufs (OPG) et de variation d'hématocrite (Δ Ht) obtenus au cours de la deuxième année (**Moyennes, écart-types**) selon les races.

Race	N	Infestation 1		Infestation 2	
		OPG1	Δ Ht (J0-J30)	OPG2	Δ Ht (J45-J75)
MTR	96	1110 (700)	- 5,8%	940 (830)	- 5,4%
MTN	37	960 (920)	- 4%	800 (740)	- 6,3%
BB	36	550 (600)	- 2,8%	990 (1400)	- 3,7%

2.4. L'EXPLOITATION GENETIQUE DES DONNEES OBTENUES.

Afin de normaliser la variance des mesures d'excrétion d'œufs, une transformation racine carrée est réalisée. Une analyse de variance avec le logiciel SAS sur le modèle :

$$OPG = \mu + \text{année_dose} + \text{race} + \text{âge} + e$$

a montré que le facteur combiné année_dose est très significatif en première et en seconde infestation, que le facteur race est très significatif en première infestation seulement et que l'âge des béliers (deux ou trois ans) n'est pas un facteur significatif. L'estimation de paramètres génétiques a été faite à l'aide du logiciel VCE (REML) avec les effets fixés année_dose, race et âge et l'effet animal en aléatoire selon le modèle :

$$OPG = \mu + \text{année_dose} + \text{race} + \text{âge} + \text{bélier} + e$$

On connaît la généalogie des béliers infestés. En modèle monocaractère, les héritabilités estimées sont de 0,07 (erreur standard de 0,12) pour OPG1 et de 0,53 (erreur

standard de 0,19) pour OPG2. L'héritabilité en première infestation est donc très faible alors qu'elle est élevée en deuxième infestation. Ceci suggère que la résistance à la seconde infestation a un déterminisme génétique très fort. Toutefois, ces résultats mériteraient d'être étayés sur un plus grand nombre d'individus, ce qui permettrait également d'estimer les corrélations génétiques entre OPG1 et OPG2.

Une indexation des béliers a été réalisée avec le logiciel GENEKIT à partir des variances génétique et résiduelle estimées, selon un modèle unicaractère pour OPG1 et OPG2. Les corrélations brutes entre l'index OPG estimé et l'intensité d'excrétion mesurée sur chaque animal sont respectivement de 0,71 et de 0,93 en première et en seconde infestation. Les corrélations entre index de résistance au parasitisme et index de production laitière sont globalement très faibles (surtout dans les deux races Manech) ce qui laisse supposer une liaison génétique quasi nulle entre ces caractères (Tableau 3). Piper et Barger (1988) n'ont pas constaté d'effet néfaste de la sélection pour la résistance aux nématodes sur les paramètres de production à l'exception notable de la fertilité (Woolaston, 1990), toutefois ces données de l'hémisphère sud ne concernent pas la production laitière.

Tableau 3 : Corrélations entre index OPG1 (première infestation), OPG2 (seconde infestation) et index de production laitière (index lait = production totale, TB : taux butyreux, TP : taux protéique).

Race	Index	Index lait	Index TB	Index TP
BB	Index OPG1	0,24	- 0,23	- 0,37
	Index OPG2	0,25	- 0,33	- 0,16
MTN	Index OPG1	0,03	0,13	- 0,21
	Index OPG2	0,07	0,19	- 0,08
MTR	Index OPG1	0,15	0,08	- 0,12
	Index OPG2	0	0,12	- 0,05

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a montré que la sélection sur phénotypes de béliers résistants aux strongles gastro-intestinaux est réalisable en centre d'élevage à l'aide d'infestations expérimentales contrôlées.

En effet, des niveaux importants de variabilité individuelle de résistance peuvent être générés sans impacter la carrière des béliers. De plus, la liaison génétique entre résistance aux strongles gastro-intestinaux et production laitière est très faible ce qui permet une sélection concomitante de ces deux caractères.

Beh K.J., Maddox J.F., 1996, *Int. J. Parasitol.*, 26 : 879-897.
 Bishop S.C., Morris C.A., 200, *Small Rum. Res.*, 70: 48-59.
 Bouix J., Krupinski J., Rzepecki R., Nowosad B., Skrzyzala I., Roborzynski M., Fudalewicz-Niemczyk W., Skalska M., Malczewski A., Gruner L., 1998, *Int. J. Parasitol.*, 28: 1797-1804.
 Cabaret J., Gasnier N., Jacquet P., 1998, *Parasite*, 5: 137-142.
 Douch P.G.C., Green R.S., Morris C.A., McEwan J.C., Windon R.G., 1996, *Int. J. Parasitol.*, 26 : 899-911.
 Getachew T., Dorchie P., Jacquet P., 2007, *Parasite*, 14 : 3-14.
 Gruner L., Cortet J., Sauvé C., Limouzin C., Brunel J.C., 2002, *Vet. Parasitol.*, 109 : 277-291.
 Gruner L., Bouix J., Brunel J.C., 2004a, *Vet. Parasitol.*, 119 : 51-58.
 Gruner L., Bouix J., Vu Tien Khang J., Mandonnet N., Eychenne F., Cortet J., Sauvé C., Limouzin C., 2004b, *Genet. Sel. Evol.*, 36 : 217-242.
 Gruner L., Cortet J., Sauvé C., Hoste H., 2004c, *Vet. Res.*, 35: 91-101.
 Harrison G.B.L., Pulford H.D., Doolin E.E., Pernthaner A., Shoemaker C.B., Hein W.R., 2008. *Par. Immunol.*, 30: 577-584.

Jacquet P., Alzieu J.P., Cabaret J., Vial-Novella C., Garrain C., Minery S., Arranz J.M., Prevot F., Bergeaud J.P., Grisez C., Cortet J., Sauvé C., Dorchie P., Gruner L., 2004. *Bull. GTV, Hors Série Parasitologie des ruminants laitiers*, 303-309.
 Jacquet P., Barillet F., Bouix J., François D., Moreno C., Terefe G., 2009, *Bull. Acad. Vét. France*, 162 : 39-46.
 Lacroux C., Nguyen T.H.C., Andreoletti O., Prévot F., Grisez C., Bergeaud J.P., Gruner L., Brunel J.C., François D., Dorchie P., Jacquet P., 2006. *Vet. Res.*, 37 : 607-622.
 Piper L.R. & Barger I.A., 1988. *Proceedings of the III World Congress of Sheep and Beef Cattle Breeding*, vol2, INRA Publ., Paris: 593-611.
 Woolaston R.R., 1990. *Proceedings of the VIIIth Conference of the Australian Association of Animal Breeding and Genetics*, vol 8, Ruakura : 163-171.