

ifce

institut français
du **cheval**
et de l'**équitation**



43^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 16 mars 2017

Identification et caractérisation de marqueurs liés aux infestations par les petits strongles pour l'optimisation des schémas de vermifugation chez les équins

G. Sallé¹, N. Mach², J. Cortet¹, C. Koch¹, F. Reigner³, M. Riou⁴, C. Canlet⁵, A. Blanchard¹.

¹ INRA, Centre Val de Loire, UMR ISP

² INRA, Centre de Jouy en Josas, UMR GABI

³ INRA, Centre Val de Loire, UE-PAO

⁴ INRA, Centre Val de Loire, UE PFIE

⁵ INRA, Centre de Toulouse, UMR TOXALIM, PLATEFORME METATOUL

Résumé

Parmi les deux grandes familles de vers parasites de l'intestin chez les chevaux, les petits strongles sont responsables de maladies graves pouvant aller jusqu'à la mort des animaux dans le cas de cyathostomoses larvaires. L'utilisation massive et non raisonnée d'antiparasitaires a conduit à l'apparition et l'émergence de populations de parasites résistants. Il est donc urgent de mettre au point des stratégies de contrôle intégrées basées sur une meilleure connaissance des interactions hôtes-parasites ainsi que sur le diagnostic précoce et rapide des animaux les plus infestés. Sur la station expérimentale du centre INRA de Nouzilly, le suivi de 2 lots de ponettes (résistantes et sensibles au parasite étudié), a permis de montrer une corrélation entre l'excrétion d'œufs de parasites et différents paramètres (ex : concentration plasmatique en urée, en phosphatase alcaline, en myo-inositol, en taurine, concentration en globules rouges, hématocrite ou encore la composition du microbiote fécal). Autant de paramètres qui peuvent, après validation, constituer des marqueurs d'infestation pour aider au diagnostic et à la mise en place de traitement ciblé.

Mots clés: cyathostomes, biomarqueurs, traitement ciblé

Summary

Among the two families of gastro-intestinal nematodes in horses, small strongyles are responsible for great damages that can lead to the death in larval cyathostomoses cases. Mass drug administration has selected for resistant populations of parasites. Consequently, there's an urgent need to develop new control strategies based on a better knowledge of the host-parasite interactions and on an early and quick diagnosis of the most heavily infected animals. A broad range of parameters (e.g. plasmatic concentration of urea, alkaline phosphatase, myo-inositol, taurine, concentration of red cells, haematocrit or faecal microbiota composition) have been significantly correlated with individual faecal egg counts in female ponies (susceptible and resistant) monitored over a grazing season. All these parameters need to be validated but they are all putative biomarkers of interest for early diagnosis and implementation of targeted selected regimens.

Key-words: cyathostomins, biomarkers, targeted treatment



Introduction

L'utilisation massive et systématique des vermifuges a conduit à l'apparition et l'émergence d'isolats parasitaires résistants (Traversa *et al.*, 2012; Peregrine *et al.*, 2014). Les méthodes de lutte les plus prometteuses reposent sur une stratégie de lutte intégrée incluant, **notamment, l'utilisation plus parcimonieuse des anthelminthiques (traitement ciblé)** pour diminuer la pression de sélection qui tend à favoriser l'apparition et l'émergence d'isolats plus pathogènes.

Actuellement, nous ne disposons d'aucun marqueur d'infestation par les cyathostomes qui soit fiable et **réellement utile pour la problématique de terrain. La coproscopie est l'outil de référence pour définir le niveau d'infestation d'un animal et orienter la vermifugation sélective.** Cependant de fortes variabilités interindividuelles dans la charge parasitaire sont généralement observées. Des approches métabolomiques comparatives (caractérisation des profils de métabolites plasmatiques) ont **d'ores et déjà permis d'identifier avec succès des marqueurs spécifiques d'infestation par d'autres nématodes parasites chez l'homme ou le hamster** (Wang *et al.*, 2010; Denery *et al.*, 2010;). Ce type d'approche chez un modèle équin pourrait permettre de définir des métabolites plasmatiques qui reflètent le niveau d'infestation et qui soient aisément mesurables.

Par ailleurs, les vers adultes s'installent et se reproduisent dans la lumière intestinale au niveau du colon. Ces vers sont en interaction étroite avec le microbiote (flore caeco-colique) qui s'y développe. Les altérations du microbiote intestinal induites par les parasites restent inconnues chez le cheval bien que des études chez **l'homme suggèrent que l'établissement des nématodes parasites intestinaux dépend de la diversité et de la structure du microbiote** (Hayes *et al.*, 2010). **L'exploration de ces interactions pourrait donner lieu à l'identification d'un profil de flore caractéristique de l'infestation par les petits strongles et éventuellement à des corrections de flore par des modifications alimentaires qui permettraient un meilleur contrôle des petits strongles.**

Notre étude vise à rechercher des paramètres hématologiques, biochimiques, métabolomiques ou **métagénomiques dont les variations peuvent être corrélées au niveau d'infestation des animaux.**

1 Recherche de biomarqueurs sanguins

Deux lots de 10 ponettes Welsh (10 les plus résistantes, groupe **“R”** et 10 les plus sensibles, groupe **“S”**), âgées de 2 à 5 ans (âge critique vis-à-vis de l'infestation par les strongles), ont été sélectionnées au sein d'un troupeau de 98 individus suivis en coprologie depuis 2010. Pour cela, une transformation logarithmique a été appliquée aux données et un modèle linéaire mixte corrigeant pour le mois, l'année, la date du dernier vermifuge et l'âge de l'animal a permis d'estimer la sensibilité relative de chaque individu (effet aléatoire). Sur la base de ces solutions centrées réduites deux lots de ponettes ont été sélectionnées pour obtenir plus de 2 écarts-types phénotypiques entre le lot résistant ($\mu = -1.18 \sigma$; âge moyen = 5.6 ans) et sensible ($\mu = +1.45 \sigma$; âge moyen = 4.7 ans). Au cours de la saison de pâture 2015 (juin-octobre), un suivi longitudinal de ces animaux a été réalisé par prélèvements sanguins et de matière fécale de manière à rechercher des biomarqueurs pouvant être corrélés au niveau d'infestation des animaux.

Les animaux, traités à la moxidectine, ont été mis au pâturage (sur 3 parcelles d'environ 3,5 ha, pâturage tournant) après un délai de 3 mois, avec à disposition de l'eau et une pierre de sel, de manière à suivre l'infestation naturelle et mesurer les paramètres avant la sortie, puis chaque mois avant l'entrée au box (4 points de prélèvements).

1.1 Suivi parasitologique

Les niveaux d'infestation par les petits strongles (seules espèces détectées) observés sur la période sont restés faibles, ne dépassant pas 850 œufs/g au maximum et avec des niveaux d'infestation moyens dans les deux lots n'excédant pas 50 œufs/g avant mi-septembre (figure 1). Les deux groupes ont ainsi montré un profil d'excrétion similaire durant l'été mais le groupe S a excrété significativement plus à partir de Septembre et Octobre ($p = 0.01$). Dans la suite des analyses, l'appartenance aux groupes prédits a été considérée comme prédictive de la sensibilité.

1.2 Paramètres hématologiques et biochimiques

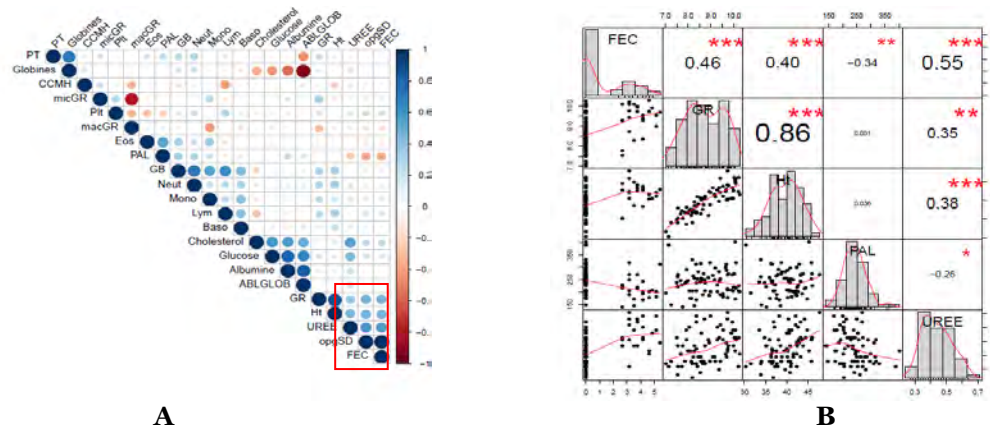
Les prises de sang (5 points de prélèvements/animal) ont permis de mesurer un large panel de paramètres hématologiques (numération formule sanguine, hématocrite avec le MS9-5 Hématologie, Melet Schloësing Laboratories, France) et biochimiques (phosphatase alcaline, protéines totales, albumines, globuline, urée, cholestérol avec le M-ScanII analyseur biochimique, Melet Schloësing Laboratories, France) qui ont été analysés en fonction du niveau d'excrétion d'œufs de chaque animal (œufs/g fèces, OPG). Si aucune



différence n'a été identifiée entre les groupes R et S, une corrélation a été mise en évidence entre le niveau d'excrétion d'œufs de parasites et la concentration en globules rouges, l'hématocrite, la concentration plasmatique en urée ou la phosphatase alcaline (Figure IA et IB). Ces premiers résultats orientent vers la caractérisation de biomarqueurs sanguins potentiels restant à confirmer.

Figure I A : **Corrélations de Spearman estimées entre l'ensemble des paramètres hémato-biochimiques et les valeurs de coproscopie normalisées (FEC) ou non (opgSD) (la taille et l'opacité croît avec la valeur absolue de la corrélation, négative (rouge) ou positive (bleu))**; La figure B, présente la distribution et les corrélations entre les valeurs de coproscopie et un nombre limité de paramètres plus fortement corrélés.

Figure IA: Estimated Spearman correlations between haemato-biochemical parameters and faecal egg count, being normalized (FEC) or not (opgSD) (opacity and size grow with absolute correlation value, negative (red) or positive (blue)). B: distribution and correlation between faecal egg count and a limited number of parameters



1.3 Analyse des métabolites plasmatiques

Les analyses métabolomiques réalisées par résonance magnétique nucléaire (RMN) sur les échantillons de plasma collectés au cours de la saison de pâture ont montré une différence entre les animaux R et S sur le dernier point de prélèvement (J132 après sortie au pâturage, octobre) (Tableau 1) ainsi que des métabolites différentiels entre les animaux R et S (Tableau 2) quel que soit le point de prélèvement considéré. Ces résultats sont en cours de validation.

Tableau 1. Métabolites différentiels à J132 entre les individus prédisés résistants et sensibles

Table 1. Differential metabolites between resistant and susceptible individuals on day 132

Métabolites	Sens de variation : Résistant → Sensible
Phénylalanine	+
Lipides (LDL)	-
Lipides (VLDL)	-
Lipides	-
Lipides insaturés	-

Tableau 2. Métabolites expliquant la variation observée entre individus résistants et sensibles

Table 2. Metabolites explaining the observed variation between resistant and susceptible individuals

Métabolites	Sens de variation : Résistant → Sensible
Taurine	+
Myo-Inositol	+
Lipides (LDL)	-

2 Recherche de biomarqueurs au niveau du microbiote fécal

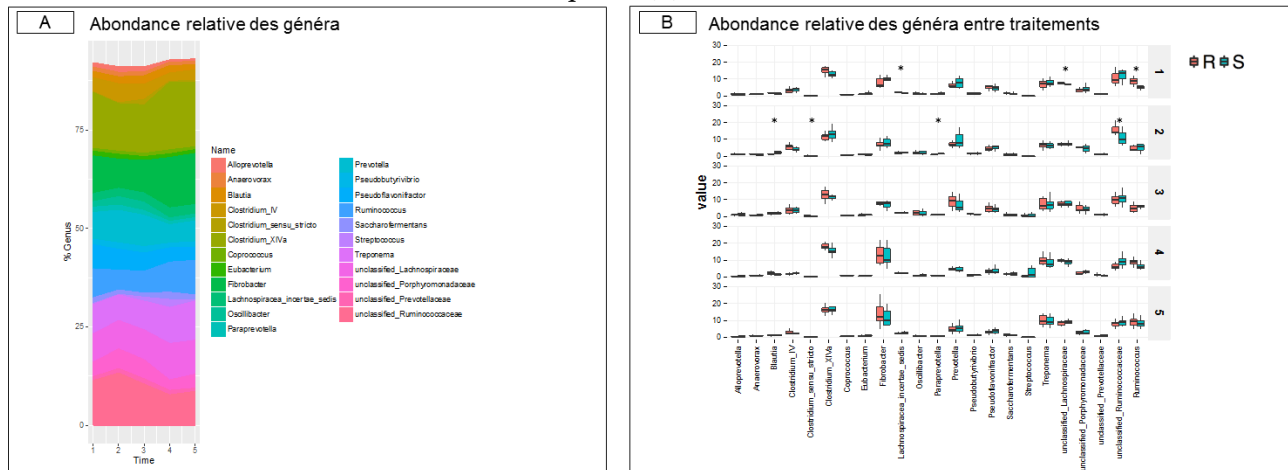
Les interactions potentielles entre la composition du microbiote fécal et le taux d'infestation des animaux (OPG) ont été étudiées au cours de la saison de pâture. L'analyse des séquences des ARN ribosomiaux 16S des procaryotes a montré des modifications de la composition du microbiote fécal en fin de saison de pâture sur l'ensemble des ponettes (Figure IIA). Par exemple, les genres *Clostridium* IV, *Prevotella*, *Pseudoflavonifractor* et *Prophylomonadaeae* dominent au niveau des deux premières mesures puis laissent place aux genres *Fibrobacter*, *Treponema*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus* et *Clostridium* (sensu stricto et XIVa) en fin de saison. Les bactéries des genres *Fibrobacter* et *Clostridium* représentent plus de 35% du microbiote sur l'ensemble de la saison de pâture. Des variations au niveau des deux premières mesures ont



également été mises en évidence entre les animaux R et S avec une discrimination bien établie grâce au genre *Ruminococcus*. D'autres genres tels que *Oscillobacter*, *Lachnospiraceae*, *Paraprevotella* et *Clostridium IV* apparaissent différemment aux deux premières mesures (Figure IIB).

Figure II : Analyse des séquences 16S du microbiote fécal au cours de la saison de pâture (A) et entre les animaux R et S (B)

Figure II: Faecal microbiome 16S sequences analysis over a pasture season (A) and between R and S ponies(B)



3 Conclusion

A l'issue du suivi longitudinal des 20 ponettes Welsh sur la saison de pâture 2016, nous avons identifié 4 paramètres sanguins corrélés à l'excrétion d'œufs de parasites. Ces marqueurs putatifs doivent être validés et ouvrent des perspectives nouvelles pour le diagnostic précoce des infestations à cyathostomes chez les équins. Par ailleurs, les variations observées entre les animaux R et S au niveau métabolites plasmatiques et microbiote fécal doivent être confirmées et permettront de mieux comprendre les interactions hôte-pathogène et d'optimiser les méthodes de contrôle.

Remerciements

Les auteurs remercient l'IFCE pour le financement accordé pour ce projet (STROMAEQ, AO2015), ainsi que la plateforme MetaToul pour la réalisation des analyses métabolomiques.

Références

- Traversa, D., Castagna, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini, R., Geurden, T., Pearce, M.C., Woringer, E., Besognet, B., Milillo, P., D'Espois, M., 2012. Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. *Vet. Parasitol.* 188, 294–300.
- Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K., 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? *Vet. Parasitol.*
- Wang, Y., Li, J.V., Saric, J., Keiser, J., Wu, J., Utzinger, J., Holmes, E., 2010. Advances in metabolic profiling of experimental nematode and trematode infections. *Adv. Parasitol.* 73, 373–404.
- Denery, J.R., Nunes, A.A.K., Hixon, M.S., Dickerson, T.J., Janda, K.D., 2010. Metabolomics-based discovery of diagnostic biomarkers for onchocerciasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4.
- Hayes, K.S., Bancroft, A.J., Goldrick, M., Portsmouth, C., Roberts, I.S., Grencis, R.K., 2010. Exploitation of the intestinal microflora by the parasitic nematode *Trichuris muris*. *Science* 328, 1391–1394.