

STRONGLES DU TRACTUS DIGESTIF DES RUMINANTS : MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX ANTHELMINTHIQUES ET CONSÉQUENCES SUR LEUR GESTION

GASTROINTESTINAL STRONGYLES OF RUMINANTS: MECHANISMS OF ANTHELMINTIC RESISTANCE AND CONSEQUENCES ON THEIR MANAGEMENT

Par Jacques CABARET, Claude CHARVET, Aymeric FAUVIN,
Anne SILVESTRE, Christine SAUVE, Jacques CORTET et Cédric NEVEU⁽¹⁾
(Communication présentée le 18 décembre 2008)

RÉSUMÉ

La gestion des infestations du tube digestif par les strongles chez les ruminants est essentiellement assurée par les traitements anthelminthiques. Seules trois familles chimiques sont disponibles et des phénomènes de résistance à ces produits sont apparus chez les strongles gastro-intestinaux. Les mécanismes de résistance concernant la famille des benzimidazoles sont relativement bien établis (un gène avec deux allèles est impliqué), alors que pour la famille des lactones macrocycliques ou celle des imidazothiazoles (lévamisole), les déterminismes génétiques, encore peu connus, sont sans doute multigéniques. Une double approche (« gènes candidats » et transcriptomique) est proposée pour le lévamisole et les premiers résultats sont présentés. La compréhension des mécanismes d'action est très importante pour tenter de réduire l'apparition de résistance. Des exemples concernant les benzimidazoles sont utilisés pour décrire l'interaction entre le type de mécanisme de résistance et la vitesse d'apparition et de diffusion de la résistance, l'efficacité des pressions sélectives par les traitements et le rôle des refuges.

Mots clés : strongles digestifs, anthelminthiques, lévamisole, résistance, ruminant, déterminisme génétique.

SUMMARY

The management of gastrointestinal strongyle infestations in ruminants relies mostly on anthelmintics. Only three chemical families are available, and gastrointestinal strongyles resistance is increasing. The resistance mechanisms are relatively well known for benzimidazoles (involving one gene with two alleles), whereas the genetic determinism of the resistance to macrocyclic lactones or imidazothiazoles (levamisole) is still poorly understood, but probably involves multigenic regulation. A double approach (candidate genes and transcriptomic) is proposed for levamisole resistance and the first results are presented. It is very important to understand resistance mechanisms to reduce their occurrences. Examples with benzimidazoles are presented to describe interactions between the type of genetic mechanism and the speed with which resistance appears and expands, the efficacy of selective pressure by treatments, and the role of refugia.

Keywords: *gastrointestinal strongyles, anthelmintics, levamisole, resistance, ruminant*

(1) INRA, IASP 213, 37800 Nouzilly, France.

INTRODUCTION

Les infestations du tube digestif par les strongles constituent un des problèmes parasitaires majeurs de l'élevage des ruminants à l'herbe. Les éleveurs ne disposent pas d'éléments indiscutables pour décider de l'opportunité des traitements, le laboratoire étant le seul à fournir des éléments objectifs. En effet, leur propre opinion, fondée sur ce qu'ils perçoivent des performances, ne constitue pas un guide vraiment efficace (Bouilhol *et al.* 2008). Le diagnostic est crucial pour une bonne gestion du traitement de ce parasitisme car l'utilisation actuelle des anthelminthiques est souvent irraisonnée. À l'échelle mondiale, les résistances aux différents anthelminthiques sont fréquentes chez les chèvres, les ovins et les bovins (Cabaret 2000) : la majorité des cas sont concentrés en Afrique du Sud, en Australie, en Nouvelle-Zélande et plus récemment, en Amérique latine (Brésil et Argentine). En Europe, la résistance aux benzimidazoles est très largement distribuée chez les petits ruminants (Chartier *et al.* 2001 ; Silvestre *et al.* 2002) ; elle reste encore peu observée chez les bovins (Coles 2002 ; Demeler *et al.* 2008), son diagnostic étant encore exceptionnellement réalisé. La résistance au lévamisole a été très récemment mise en évidence en France dans un élevage caprin (Paraud *et al.*, 2009), ce qui implique une certaine vigilance, même pour les molécules qui présentent le moins de résistance pour les strongles. Nous sommes donc face à deux exigences :

- i) le contrôle du parasitisme par les strongles passe presque exclusivement par l'utilisation d'anthelminthiques,
- ii) les phénomènes de résistance en augmentation nous imposent d'utiliser avec la plus grande rigueur ces molécules anthelminthiques, afin de pérenniser leur usage, car la commercialisation de nouvelles molécules se fait attendre depuis les années 80.

Cette rigueur passe par le diagnostic de la résistance, afin de pouvoir suivre son évolution. Il est réalisé par des méthodes phénotypiques (évaluation de l'excrétion des œufs de strongles après un traitement) ou de biologie moléculaire (il faut alors un marqueur, ou mieux connaître un gène impliqué dans cette résistance). Le diagnostic de résistance par les méthodes de biologie moléculaire est pratiqué uniquement pour les benzimidazoles (Humbert *et al.* 2001). Le travail de modélisation sur la résistance des strongles de Barnes *et al.* (1995) permet d'apprécier l'importance de la connaissance des mécanismes dans la compréhension de l'évolution de la résistance, ainsi que les moyens mis en œuvre pour contrecarrer sa diffusion. Le présent article a pour objectifs :

- i) de montrer l'importance des mécanismes de résistance dans la conception de la lutte contre ces parasites,
- ii) de présenter les mécanismes actuellement connus ou étudiés au sein de l'INRA, en se focalisant plus particulièrement sur une molécule encore ressource en Europe, le lévamisole.

LES FAMILLES D'ANTHELMINTHIQUES

Les anthelminthiques disponibles, peu nombreux, sont classés en trois familles selon leur mode d'action, les benzimidazoles et pro-benzimidazoles, les avermectines, et le lévamisole (et le tétramisole encore utilisé dans les pays en voie de développement), ainsi que les dérivés des tetrahydropyrimidines (pyrantel et morantel) qui se rapprochent par le mode d'action, du lévamisole. Les mécanismes de résistance sont présentés dans le *tableau 1* ; ils sont cependant loin d'être élucidés, même pour les benzimidazoles pourtant les plus étudiés. Ce classement en familles n'a de sens que dans la mesure où la résistance montrée par un nématode contre une famille d'anthelminthiques ne préjuge pas de la résistance aux autres familles. Dans des zones où la résistance à plusieurs molécules est commune, en Australie par exemple, des associations triples ou quadruples sont proposées pour lutter contre les peuplements de strongles résistants (Triton® : ivermectine, levamisole, albendazole ou Q-drench® Multi-combination Drench for Sheep : abamectine, albendazole, closantel, lévamisole).

Familles d'anthelminthiques	Mécanisme de résistance	Commentaires
Benzimidazoles	Isotype 1 de la β -tubuline : mutation point en position 200.	Résistance la plus étudiée au plan phénotypique et moléculaire. Mutation point en position 200, rencontrée chez les principaux strongles de ruminants résistants aux benzimidazoles. D'autres mutations points possiblement impliquées (Mottier & Prichard, 2008).
	Isotype 2 de la β -tubuline : mutation point ou délétion.	Importance mineure chez les strongles et controversée chez les douves résistantes au triclabendazole. (Ryan <i>et al.</i> , 2008).
Lactones macrocycliques : Avermectines et milbemycines	Mutations des canaux chlore des récepteurs du glutamate ou de l'acide gamma aminobutyrique (GABA).	Mise en évidence chez <i>Cooperia oncophora</i> (Njue <i>et al.</i> 2004) par les méthodes de biologie moléculaire.
	Surexpression des P-glycoprotéines.	Rôle dans d'autres résistances (Kerboeuf <i>et al.</i> 2003).
Imidazothiazole : Lévisole	Changements dans les récepteurs nicotinniques de l'acétylcholine.	Encore très peu d'information sur les mécanismes moléculaires chez les strongles ; résistance commune avec les dérivés de la tetrahydropyrimidine (Pyrantel, Morantel).

Tableau 1 : Mécanismes possibles de résistance des strongles aux trois grandes familles d'anthelminthiques du marché. (Modifié de Wolstenholme *et al.* 2004).

STRATÉGIES D'ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE DES STRONGLES AU LEVAMISOLE

Parmi les trois familles d'anthelminthiques les plus couramment utilisées, les imidazothiazoles (lévamisole) sont restés efficaces malgré une utilisation pendant plusieurs décennies. En effet, l'acquisition de la résistance au lévamisole est moins fréquente et moins rapide que celle aux benzimidazoles et aux avermectines. Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la résistance au lévamisole est déterminante pour prolonger l'efficacité des traitements.

Le lévamisole est un agoniste cholinergique spécifique des nématodes et les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine sensibles au lévamisole (L-AChR) constituent la cible majeure des traitements antihelminthiques. Leur rôle déterminant dans l'acquisition de la résistance a été démontré en comparant les courbes de déplacement de l'équilibre agoniste-récepteur, dans des isolats de strongles *Haemonchus contortus*, résistants et sensibles au lévamisole (Sangster *et al.* 1998), puis dans ceux de larves L3 d'un nématode parasite *Oesophagostomum dentatum* (Martin *et al.* 2003). Les résultats suggèrent que la résistance est associée à une diminution de l'affinité et/ou du nombre des récepteurs du lévamisole.

Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la résistance au lévamisole, deux approches complémentaires sont actuellement développées à l'INRA. La première est basée sur une stratégie des « gènes candidats » et la seconde, sur une analyse différentielle des transcriptomes de strongles, issus d'isolats sensibles et résistants au lévamisole.

Stratégie des « gènes candidats »

Les bases génétiques de la résistance au lévamisole sont étudiées chez le nématode modèle *Caenorhabditis elegans*. Chez cette espèce, très proche phylogénétiquement des strongles, la sélection de mutants résistants au lévamisole a permis d'identifier 14 gènes pouvant être impliqués dans le phénotype (Fleming *et al.* 1997; Culetto *et al.* 2004; Towers. 2005). Parmi ces gènes, *unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* et *lev-8* codent des sous-unités protéiques qui participent à la constitution du récepteur nicotinique de l'acétylcholine sensible au lévamisole (L-AChR). Récemment, chez le même modèle, ont été identifiés cinq gènes indispensables à la synthèse des L-AChRs : trois gènes codant des sous-unités α , deux, des sous-unités non- α et trois, des protéines auxiliaires impliquées dans l'assemblage et le trafic des récepteurs (Boulin *et al.* 2008). Il apparaît donc que les gènes codant les sous-unités du L-AChR, mais aussi ceux impliqués dans la régulation de sa synthèse, sont des candidats particulièrement intéressants.

Notre objectif prioritaire a été le clonage des gènes orthologues de *unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1* et *lev-8* chez les trois principales espèces de strongles d'intérêt agronomique ayant développées des résistances au lévamisole : *Haemonchus*

contortus, *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Les orthologues de tous ces gènes ont été identifiés et clonés chez les trois espèces à l'exception de l'orthologue du gène *lev-8* qui ne semble pas être présent chez les strongles étudiés.

Dans des isolats d'*H. contortus* sensibles et résistants au lévamisole, la comparaison des séquences des ADNc complets correspondant aux différentes sous-unités du L-AChR n'a pas permis de mettre en évidence de polymorphisme associé à la résistance. En revanche, l'analyse de l'expression des sous-unités du récepteur a révélé l'existence de transcrits tronqués, spécifiquement exprimés dans les isolats résistants pour les sous-unités orthologues de *unc-38* et *unc-29*. Ces transcrits pourraient résulter d'événements d'épissage alternatif conduisant à la production de sous-unités tronquées du récepteur du lévamisole. À l'heure actuelle, l'implication de ces protéines tronquées dans la résistance au lévamisole reste à déterminer, cependant les récents progrès réalisés dans le domaine de l'expression des sous-unités du récepteur du lévamisole dans des systèmes hétérologues, tels que l'œuf de Xénope, offrent des perspectives particulièrement prometteuses (Boulin *et al.* 2008).

Approche transcriptomique

En complément de l'approche par l'étude des gènes candidats, une analyse différentielle des transcriptomes de nématodes issus de populations d'*H. contortus* résistantes et sensibles au lévamisole a été réalisée. Son but est d'identifier d'une part des marqueurs de résistance et d'autre part, un ou plusieurs gènes impliqués dans un éventuel mécanisme d'acquisition de la résistance spécifique aux strongles digestifs.

Pour cette étude, quatre populations (deux résistantes et deux sensibles) isolées indépendamment dans des élevages d'origine géographique distincte ont été utilisées. Pour chacune d'elles, environ 8640 fragments de transcrits ou TDF (Transcript Derived Fragment) ont été amplifiés par la technique cDNA-AFLP (Bachem *et al.* 1996). Parmi ces TDF, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ceux présentant un polymorphisme commun aux populations résistantes ou sensibles. Au total, 34 candidats ont été identifiés et l'un d'entre eux, nommé HA17, a été caractérisé plus en détail. Ce gène, spécifiquement exprimé chez les isolats résistants, correspond au premier marqueur de résistance au lévamisole identifié à ce jour chez un nématode (Neveu *et al.* 2007). La caractérisation des autres candidats nous a permis de mettre en évidence l'expression spécifique, chez les populations résistantes testées, d'une forme tronquée d'un transcrit correspondant à l'orthologue d'un gène de *C. elegans* codant une sous-unité du récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Ce candidat pourrait donc participer à la formation du récepteur du lévamisole chez les strongles et les formes tronquées observées pourraient être impliquées dans le phénotype de résistance.

DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE ET CONSÉQUENCES SUR L'ÉVOLUTION DE LA RÉSISTANCE

Le déterminisme génétique joue un rôle essentiel dans les modalités de l'évolution de la résistance. Il est le résultat ultime de l'étude de la résistance au niveau moléculaire. Il peut être aussi approché par des travaux de modélisation, fondés sur différentes hypothèses.

Déterminisme mono ou polygénique

La sélection de la résistance est plus rapide si le mécanisme dépend d'un seul gène plutôt que de plusieurs (dans l'hypothèse d'un effet additif des n allèles de résistance et d'un équilibre de liaison entre les gènes) (Barnes *et al.* 1995). La dominance ou la codominance des allèles de résistance ont aussi des effets marqués sur l'évolution de la résistance. Dans le modèle d'un gène avec deux allèles, la résistance évolue plus rapidement quand elle est dominante, plus lentement quand elle est codominante et encore plus lentement, quand elle est récessive. Ces hypothèses, sur le mécanisme génétique des résistances, sont très difficiles à vérifier sur des résultats expérimentaux, car d'autres phénomènes peuvent interférer avec ce mécanisme, comme par exemple la capacité adaptative des génotypes résistants et sensibles. Cela montre la grande nécessité des études moléculaires qui permettront de définir réellement le déterminisme des résistances.

Exemple chez les benzimidazoles

C'est la résistance la plus étudiée et la plus répandue.

Déterminisme monogénique et récessif

Le déterminisme génétique de la résistance aux benzimidazoles a été mis en évidence par Kwa *et al.* (1994) chez le strongle *Haemonchus contortus*. Une mutation point en position 200 induit la résistance. Seuls les individus possédant les deux allèles de résistance sont résistants aux benzimidazoles. Ce mécanisme récessif a été retrouvé chez la majorité des espèces de strongles (*Teladorsagia circumcincta*, Elard *et al.* 1999; *Trichostrongylus colubriformis*, Grant & Mascord 1996; *Trichostrongylus axei*, Palcy *et al.* 2008).

Résistance et pression de sélection par les anthelminthiques

Le nombre de traitements est un élément fondamental de la sélection (Silvestre *et al.* 2002; Gaba *et al.* 2006). En Auvergne, des traitements peu fréquents, utilisant les trois grandes familles ont toutefois abouti à une résistance aux benzimidazoles. De même, au Maroc dans la région de Rabat, des résistances aux benzimidazoles sont présentes malgré la faible fréquence des traitements par ces molécules. C'est donc l'efficacité sélective des traitements qui joue un rôle, plutôt que leur nombre. D'autres facteurs ont également un poids très important, la fréquence des introductions d'animaux étrangers au troupeau ou la présence de refuges.

Résistance et impact sur la « fitness » (maintien de la résistance ou réversion)

Globalement, la « fitness » (valeur reproductive) semble identique entre les individus sensibles et résistants, au moins pour *T. circumcincta*, tant dans les conditions expérimentales (Elard *et al.* 1998) que naturelles (Leignel 2000). Toutefois, certains traits de vie (fertilité des vers et vitesse d'évolution du stade larvaire au stade adulte) sont différents chez les souches sensibles ou résistantes chez *T. circumcincta* (Leignel & Cabaret, 2001) ou *Haemonchus contortus* (Melo 2005). Il semble que les aptitudes des vers sensibles à l'aune de la durée ne soient pas inférieures à celles des vers résistants même si certaines sont affectées positivement ou négativement. Ainsi chez *H. contortus*, les vers résistants ont une meilleure faculté à s'installer chez l'hôte, une meilleure fertilité, mais par contre le développement des œufs émis est inférieur dans des conditions correspondant aux périodes chaudes (Melo 2005); toutefois, globalement, la « fitness » sur plusieurs générations n'est pas statistiquement différente entre les populations résistantes et sensibles. Les changements de famille d'anthelminthiques peuvent avoir des conséquences importantes sur la faune des strongles. Le cas de *T. axei* (Palcy *et al.* 2008) mérite d'être mentionné: dès l'arrêt des traitements par les benzimidazoles, au cours desquels ils ont acquis une résistance, la proportion des vers résistants n'a cessé de diminuer pendant les six années d'études. En fait, la fréquence de ce parasite est plus élevée lorsque celles des autres espèces diminue, ce qui serait sans doute le résultat d'interactions négatives (capacité à l'installation ou durée de survie des vers) avec les autres espèces de strongles (Cabaret & Hoste, 1998). Cette diminution peut être imputée au développement des autres espèces de strongles sensibles, qui ne sont plus défavorisées par les traitements par les benzimidazoles. Cette réversion apparente pour *T. axei* ne serait donc qu'une conséquence des interactions entre espèces.

Résistance et impact sur les refuges (maintien des allèles de sensibilité)

La notion de refuge a été prise par les nématologistes d'une façon très large, alors que primitivement, cette définition est restrictive pour les généticiens des populations, puisqu'elle porte sur des fragments de population (incluant tous les stades du cycle parasitaire). Pour les strongles, ce qui est central est le fait qu'une population ou certains stades de la population échappent à la pression de sélection par les anthelminthiques. Le rôle de ces refuges a été initialement remarqué par van Wyk (2001) et leur participation dans l'établissement de la résistance a été confortée par modélisation (Gaba *et al.* 2006) ou par des constatations d'experts (Kenyon *et al.* 2008). Ainsi, l'existence de parcelles utilisées contaminées par des animaux non traités, le fait que seulement certains animaux (ceux que l'on suppose à haut risque) soient traités (ce qui est le principe des traitements individuels sélectifs ou TST, Cabaret 2008) sont des moyens de nourrir ces refuges. Le maintien de ces refuges, s'il est efficace pour contenir l'évolution de la résistance, est toutefois une contrainte pour gérer l'intensité de l'infestation. Un compro-

mis est donc à trouver entre le contrôle de l'infestation et la gestion de la résistance. Ce compromis est relativement facile à trouver, et les éleveurs qui utilisent ce système TST ne sont pas pénalisés au plan des productions (Van Wyk & Bath 2002, Benoit *et al.* 2009).

CONCLUSIONS

La résistance aux anthelminthiques est un phénomène généralisé et il concerne surtout actuellement les benzimidazoles. Elle

est très fréquente chez les petits ruminants et beaucoup moins chez les bovins. L'existence de cette résistance oblige à adapter une stratégie du contrôle des strongles. Il n'est plus question d'envisager le traitement des animaux pour éradiquer les strongles, mais au contraire d'accepter que des animaux ne soient pas traités, que des parcelles contaminées soient des sources pour le maintien des « bons allèles » de sensibilité aux anthelminthiques. Il est certain que des études concernant le mécanisme de transmission de la résistance sont essentielles et permettront une lutte plus adéquate contre les strongles.

REMERCIEMENTS

Les financements du Comité INRA pour l'Agrobiologie, du projet européen Parasol, du département de Santé animale pour la thèse de S. Gaba, de la Région Martinique pour celle de C. Palcy et de la région Centre pour A. Fauvin ont été une aide décisive pour accomplir certains des travaux présentés dans cette revue.

BIBLIOGRAPHIE

- Bachem, C.W.B., Van der Hoeven, R.S., De Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M., Visser, R.G. 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal* 9 (5) : 745–753.
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Barger, I.A. 1995. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today* 11 (2) : 56–63.
- Benoit, M., Tournadre, H., Dulphy, J.P., Laignel G., Prache, S., Cabaret, J. 2009 Is intensification of ewe reproduction rhythm sustainable in an organically managed sheep production system? A four-year interdisciplinary study. *Animal* (sous presse).
- Boulin, T., Gielen, M., Richmond, J.E., Williams, D.C., Paoletti, P., Bessereau, J.L. 2008. Eight genes are required for functional reconstitution of the *Caenorhabditis elegans* levamisole-sensitive acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 105 (47) : 18590–18595.
- Cabaret, J. 2000. Anthelmintic resistance in goats: from fiction to facts. In *Proceeding of the 7th international conference on goats*, Tours-Poitiers, (France), pp. 793–794.
- Cabaret, J. 2008. Pro and cons of targeted selective treatment against digestive-tract strongyles of ruminants. *Parasite* 15 (3) : 506–509.
- Chartier, C., Soubirac, F., Pors, I., Silvestre, A., Hubert, J., Couquet, C., Cabaret, J. 2001. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *Journal of Helminthology* 75 (4) : 325–330.
- Coles, G.C. 2002. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? *Veterinary Research* 33 (5) : 481–490.
- Culetto, E., Baylis, H.A., Richmond, J.E., Jones, A.K., Fleming, J.T., Squire, M.D., Lewis, J.A. & Satelle, D.B. 2004. The *Caenorhabditis elegans* unc-63 gene encodes a levamisole-sensitive nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *The Journal of Biochemical Chemistry* 279 (41) : 42476–42483.
- Demeler, J., Van Zeveren, A. M. J., Kleinschmidt, N., Vercruyse, J., Höglund, J., Koopman, R., Cabaret J., Claerebout, E., Areskog, M., Von Samson-Himmelstjerna, G. 2008. Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro-intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Veterinary Parasitology*, 2008 Oct 19 (sous presse).
- Elard, L., Comes, A. M., Humbert, J.F. 1996. Sequence s of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Molecular and Biochemical Parasitology* 79 (2) : 249–253.
- Elard, L., Sauve, C., Humbert, J.F. 1998. Fitness of benzimidazole-resistant and -susceptible worms, a nematode parasite of small ruminants. *Parasitology* 117 (6) : 571–578.
- Fleming, J.T, Squire, M. D., Barnes, T.M., Tornoe, C., Matsuda, K., Fire, A., Barnard, E. A., Satelle, D.B., Lewis, J.A. 1997. *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29* and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Journal of Neuroscience* 17 (15) : 5843–5857.
- Gaba, S., Cabaret, J., Ginot, V., Silvestre, A. 2006. The early drug selection of nematodes to anthelmintics : stochastic transmission and population in refuge. *Parasitology* 133 (3) : 345–356.
- Grant, W.N., Mascord, L.J., 1996. Beta-tubulin gene polymorphism and benzimidazole resistance in *trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 26 (1) : 71–77.
- Humbert, J.F, Cabaret, J., Elard, L., Leignel, V., Silvestre A. 2001. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. *Veterinary Parasitology* 101 (3/4) : 405–414.
- Kenyon, F, Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J, Berrag, B, Varady, M, Van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruyse, J., Jackson, F. 2008. The role of targeted and targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology* (sous presse).
- Kerboeuf, D., Blackhall, W., Kaminsky, R., von Samson-Himmelstjerna, G. 2003. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of antimicrobial agents* 22 (3) : 332–346.
- Kwa, M.S., Veenstra, J.G., Roos, M.H. 1994. Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved

- mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology* 63 (2) : 299–303.
- Leignel, V. 2000. *Diversité génétique et résistance aux benzimidazoles chez Teladorsagia circumcincta (Nematoda, Trichostrongylidae), parasite de petits ruminants*. Thèse Université Montpellier II, France, 170 p.
 - Leignel, V., Cabaret, J. 2001. Massive use of chemotherapy influences life traits of parasitic nematodes in domestic ruminants. *Functional Ecology* 15 (5) : 569–574.
 - Martin R.J., Bai, G., Clark, C.L., Robertson, A.P. 2003. Methyridine and levamisole activate different Ach receptor subtypes in nematode parasite: a new lead for levamisole resistance. *British Journal of Pharmacology* 140 (6) : 1068–1076.
 - Melo, A.C. 2005. *Resistance to benzimidazoles in nematode Haemonchus contortus in Ceara State*. Thèse Université de Ceara, Fortaleza, Brésil, 170 p.
 - Mottier, M.D., Prichard, R.K. 2008. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenetics and Genomics* 2 (2) : 129–140.
 - Neveu C., Charvet, C. Fauvin, A., Cortet, J., Cabaret, J. 2007. Identification of levamisole resistance markers in the parasitic nematode *Haemonchus contortus* using a cDNA-AFLP approach. *Parasitology* 134 (8) : 1105–1110.
 - Njue, A.I., Hayashi, J., Kinne, L., Feng, X.P., Prichard R.K. 2004. Mutations in the extracellular domain of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β , subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *Journal of Neurochemistry* 89 (5) : 1137–1147.
 - Palcy, C., Silvestre, A., Sauve, C., Cortet, J., Cabaret, J. 2008. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. *The Veterinary Journal*, 2008 Nov 1 (sous presse).
 - Paraud, C., Kulo, A., Pors, I., Chartier, C. 2009. Multiple anthelmintic resistance in goat nematodes on a farm in France. *Veterinary Record*, (sous presse).
 - Ryan, L., Hoey, E., Trudgett, A., Fairweather, I., Fuchs, M., Robinson, M.W., Chambers, E., Timson, D.J., Ryan, E., Feltwell, T., Ivens, A., Bentley G. & Johnston, D. 2008. *Fasciola hepatica* expresses multiple α - and β -tubulin isotypes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 159 (1) : 73–78.
 - Sangster, N.C., Riley, F.L., Wiley, L.J. 1998. Binding of [3H]m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 28 (5) : 707–717.
 - Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J.F., Chartier, C., Cabaret, J. 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary Research* 33 (5) : 465–480.
 - Towers, P.R., Edwards, B., Richmond, J.E., Satelle, D.B. 2005. The *Caenorhabditis elegans lev-8* gene encodes a novel type of nicotinic acetylcholine receptor α subunit. *Journal of Neurochemistry* 93 (1) : 1–9.
 - Van Wyk, J.A., 2001. Refugia - overlooked as perhaps the most important factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 68 (1) : 55–67.
 - Van Wyk, J.A. & Bath G.F. 2002. The Famacha[®] system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research* 33 (5) : 509–529.
 - Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna G., Sangster, N.C. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20 (10) : 469–473.