

Facteurs influençant le phénotype de réponse d'*Onchocerca volvulus* à l'ivermectine

M. Boussinesq (DR2)¹, C. Bourguinat (post-doc)², J. Cabaret (DR1)³, C. Charvet (ingénieur)³, J. Kamgno (chargé de cours)⁴, H. Nana-Djeunga (doctorant)⁵, F. Njiokou (maître de conférence)⁵, S.D. Pion (CR2)¹, R.K. Prichard (PU)² et S. Wanji (PU)⁶*

¹ UMR-145 IRD-UM1, IRD, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5 ; ² Institut de parasitologie, McGill University, 21111 Lakeshore Road, Sainte-Anne-de-Bellevue, Québec, H9X 3V9, Canada ; ³ UR-1282 INRA, INRA bâtiment 213, 37380 Nouzilly ; ⁴ Département de Santé publique, FMSB, Université Yaoundé 1, BP 1364, Yaoundé, Cameroun ; ⁵ Département de Biologie et de physiologie animales, Faculté des Sciences, Université Yaoundé 1, BP 812, Yaoundé, Cameroun ; ⁶ Department of Life Sciences, Faculty of Science, University of Buea, PO Box 63, Buea, Cameroun

Introduction

Rappel sur l'onchocercose et la biologie d'*Onchocerca volvulus*

L'onchocercose est causée par un parasite de la famille des filaires : *O. volvulus*. Ce nématode est transmis par des insectes vecteurs se reproduisant dans les cours d'eau, les simules. Les vers adultes, dont la longévité dépasse 10 ans, vivent pelotonnés dans des nodules sous-cutanés ou profonds. Ils produisent des millions d'embryons, les microfilaries (mfs), qui constituent le stade pathogène du parasite. La production des mfs se fait de façon cyclique et chaque cycle de reproduction, qui dure 2-4 mois, nécessite une ré-insémination des vers femelles par des mâles qui migrent de nodule en nodule (18). Les mfs sortent activement du tractus génital des vers femelles et migrent dans la peau et les tissus de l'œil. Les réactions inflammatoires qu'elles induisent provoquent des lésions oculaires pouvant conduire à la cécité, des atteintes cutanées parfois sévères et d'autres manifestations (épilepsie, etc.). Environ 37 millions de personnes sont infectées par *O. volvulus*, dont 99% vivent en Afrique (4).

Principaux effets de l'ivermectine sur *O. volvulus* : observations après un premier traitement

La lutte contre l'onchocercose est aujourd'hui basée sur le traitement de masse des populations endémiques par l'ivermectine (IVM). Le médicament, qui fait l'objet d'une donation, a deux effets principaux sur le parasite. Le premier est un effet direct sur les mfs (effet microfilaricide), probablement modulé par le système immunitaire de l'hôte (1). Ainsi, les charges microfilarieuses dermiques sont abaissées de 95% une semaine après le traitement et atteignent un minimum en un à deux mois (3). Par ailleurs, l'IVM bloque temporairement la libération de nouvelles mfs par les vers adultes (effet embryostatique). Un traitement unique par IVM n'ayant pas d'effet direct ni sur l'oogenèse, ni sur l'embryogénèse (8), les mfs qui continuent à être produites s'accumulent dans les utérus, puis sont résorbées in situ en moins de quatre semaines (18). Par la suite, une nouvelle insémination des femelles – la spermatogénèse et le processus d'insémination ne semblent pas altérées après un premier traitement (8, 12) – déclenche un nouveau cycle reproductif. L'effet embryostatique de l'IVM s'étant alors atténué, les nouvelles mfs peuvent s'échapper des vers femelles et à nouveau envahir le derme. Une remontée progressive des charges microfilarieuses est ainsi observée à partir de deux à trois mois après

* Adresses courriel : michel.boussinesq@ird.fr; choupcathe@yahoo.fr; jacques.cabaret@tours.inra.fr; claude.charvet@tours.inra.fr; jkamgno@yahoo.fr; nanaclotaire@yahoo.fr; njiokouf@yahoo.com; sebastien.pion@ird.fr; roger.prichard@mcgill.ca; swanji@yahoo.fr

le traitement. Le médicament n'ayant qu'un effet limité sur la longévité des vers adultes (13), les traitements doivent être répétés régulièrement (en pratique, tous les six mois ou tous les ans) pour maintenir les charges au-dessous du seuil au-delà duquel apparaissent les signes cliniques.

Effets de traitements répétés par ivermectine sur *O. volvulus*

Les effets microfilaricide et embryostatique de l'IVM expliquent l'évolution des charges microfilariennes après un premier traitement. Mais des doses successives ont d'autres conséquences sur la biologie du parasite. Ainsi, le nombre de stades embryonnaires viables dans les utérus des femelles est extrêmement réduit six mois après quatre traitements semestriels (9). Il remonte cependant ensuite si les sujets sont laissés sans traitement (15). La chute de la densité d'embryons intra-utérins est consécutive à une altération du processus d'insémination des femelles qui pourrait être due à un effet de l'IVM sur la spermatogenèse ou sur l'accouplement des vers, ou à un blocage du sperme par la masse de mfs dégénérées dans les utérus (8). La reprise ultérieure de la production embryonnaire serait rendue possible par la résorption des mfs dégénérées. Outre cet effet indirect sur l'embryogenèse, des traitements répétés pourraient aussi avoir un effet sur l'oogenèse (8).

Le risque de résistance d'*O. volvulus* à l'ivermectine

Lors des distributions, plus de 70% de la population reçoit le médicament et il existe donc peu de parasites échappant à la pression médicamenteuse. Par ailleurs, depuis 2004, des réponses sub-optimales à l'IVM, caractérisées par une remontée plus rapide qu'attendu des charges microfilariennes après traitement, ont été signalées (2, 16). De plus, plusieurs populations de nématodes parasites d'animaux sont devenues résistantes à l'IVM, parfois en quelques années (14). Enfin, nous avons montré que des traitements répétés par IVM entraînent une sélection sur des gènes potentiellement associés à une résistance (β -tubuline, P-glycoprotéine et *P-glycoprotein-like protein*) (5, 6) et que le statut reproductif des vers varie selon qu'ils sont homo- ou hétérozygotes pour le gène de la β -tubuline (7). Ces observations et la forte pression médicamenteuse exercée sur *O. volvulus* nous ont incités à évaluer si une résistance à l'IVM est en train d'émerger chez ce parasite.

Objectifs principaux de l'étude

Nos principaux objectifs étaient (a) de caractériser la réponse au traitement par IVM dans deux populations du Cameroun, l'une traitée de manière répétée depuis plus de 10 ans et l'autre jamais traitée (population « naïve »), (b) de génotyper des parasites (microfilaires et vers adultes) récoltés chez les sujets, et (c) de confronter au niveau individuel (hôtes et parasites) les résultats concernant le génotype et le phénotype de réponse au traitement.

Matériel et méthodes

Sélection des sujets

Le groupe multi-traité a été sélectionné au sein d'une population de la vallée du Mbam (province du Centre) ayant pris part à une étude précédente (13). Ces personnes, résidant dans 22 villages, avaient reçu des doses annuelles ou trimestrielles d'IVM entre 1994 et 1998. Une partie des parasites récoltés en 1994 et 1997 avaient été génotypés (5-7). A partir de 1998, ces sujets ont bénéficié de traitements annuels dans le cadre du Programme national de lutte contre l'onchocercose. Des informations concernant leur assiduité au traitement avant 2007 (début de la présente étude) ont été collectées par interrogatoire et par l'examen des registres des distributeurs communautaires d'IVM. Les sujets naïfs ont

été sélectionnés dans 10 villages de la vallée du Nkam (Province du Littoral) où aucun traitement de masse n'avait été organisé jusqu'en 2007.

N'ont été inclus dans l'étude que des hommes âgés de 25 ans et plus, n'ayant pas reçu d'IVM au cours des six mois précédents et présentant au moins deux nodules onchocerciens palpables. Dans le Nkam, quelques personnes avaient reçu le médicament ailleurs et les informations à ce sujet ont été recueillies. Dans ce site, seuls les sujets ayant reçu au plus trois traitements étaient éligibles au début de l'étude.

Collecte et examen des parasites

Le phénotype de réponse au traitement a été apprécié en suivant l'évolution des charges microfilariennes et en estimant les capacités de reproduction des vers adultes avant et après traitement.

Les charges microfilariennes ont été suivies par l'examen de biopsies cutanées prélevées à J0 (avant traitement), J15, J80 et J180. Ce suivi n'a été fait que pour les sujets présentant au moins deux mfs dans les biopsies prélevées à J0. Chaque biopsie a été pesée avec une précision de 0,1 mg. La chute des charges entre J0 et J15 et leur remontée entre J15, J80 et J180 ont été analysées en vue de déterminer, respectivement, l'intensité des effets microfilaricide et embryostatique de l'IVM sur les parasites.

Les vers adultes ont été recueillis à partir de nodules prélevés chirurgicalement à J0 et J80. Au début de l'étude, la localisation de chaque nodule trouvé à l'examen des sujets a été notée sur une planche anatomique individuelle. Les nodules devant être prélevés à J0 et J80 ont été tirés au sort à partir de cette planche. Quand plusieurs nodules étaient présents au niveau du site de l'intervention, ils étaient tous enlevés. Tous les prélèvements ont été conservés en azote liquide. Après incubation dans la collagénase, les nodules ont été disséqués à la loupe pour isoler les parasites adultes, qui ont été dénombrés. Les femelles ont été coupées à 1cm de leur extrémité postérieure afin de recueillir du matériel sans ADN embryonnaire pour le génotypage. Chaque femelle a ensuite été broyée dans 1 ml de milieu et 5µl de l'homogénat ont été examinés au microscope. Les oocytes et les stades embryonnaires normaux et dégénérés (morulas, mfs enroulées et mfs étirées) présents dans les utérus ont été dénombrés afin d'établir l'embryogramme du ver. Les quantités présentées plus loin correspondent au nombre d'embryons trouvés dans ces 5 µl d'homogénat (unité embryogramme : UE).

Analyses statistiques

L'analyse de l'évolution des charges microfilariennes dans la population naïve (Nkam) a été limitée aux sujets n'ayant jamais reçu de traitement par IVM. Les premiers résultats obtenus nous ont conduits à mener des analyses supplémentaires visant à déterminer si des facteurs individuels influençaient l'évolution des charges après traitement. Une analyse a d'abord été effectuée uniquement sur les données du Nkam et trois facteurs ont été pris en compte dans le modèle : l'âge du sujet, le nombre de nodules (ou de groupes de nodules) palpables relevés à l'examen initial et la charge microfilarienne à J0. Une analyse combinant les données du Mbam et du Nkam a ensuite été effectuée. Les charges initiales des patients du Mbam n'étant pas en équilibre, nous n'avons, lors de cette phase, inclus que deux facteurs individuels dans l'analyse : l'âge et le nombre de nodules palpables. Compte tenu de la surdispersion des charges microfilariennes dans la population, nous avons utilisé des modèles de régression binomiale négative.

L'analyse du contenu des nodules et du statut reproductif des vers adultes a été effectuée sur tous les prélèvements du Mbam. Dans le Nkam, nous avons exclu des analyses tous les individus ayant reçu un traitement au cours des cinq années précédentes (2002-2006). Les analyses ont été faites en prenant le ver femelle comme unité et ont été limitées aux sujets pour lesquels un embryogramme avait été fait pour au moins un parasite (les sujets dont les nodules étaient calcifiés ou ne contenaient que des vers morts

ont été exclus). Trois variables principales ont été utilisées successivement pour caractériser le statut reproductif des vers femelles : le nombre total d'embryons dans les utérus (morulas, mfs enroulées et mfs étirées, viables ou non), le nombre de mfs étirées viables et le nombre de mfs étirées dégénérées. Six variables explicatives ont été prises en compte dans l'analyse : le site d'étude (Nkam ou Mbam), l'âge du sujet, le nombre de nodules palpables, le nombre de nodules retrouvés au site de nodulectomie, et le nombre de vers femelles et de vers mâles dans le nodule d'origine du parasite. Au cours de nos analyses, nous avons pris en compte le caractère potentiellement corrélé de certaines données (par exemple lors de l'analyse de vers provenant d'un même nodule ou d'un même patient, ou lors de l'analyse du suivi des charges dermiques individuelles entre J15, J80 et J180) en incluant des effets aléatoires dans nos modèles de régression (modèles mixtes).

Résultats

Population étudiée

Au total, 205 sujets du Mbam et 194 sujets du Nkam ont été examinés à J0. Parmi ces derniers, 120 n'avaient jamais été traités par IVM et 47 avaient reçu au moins un traitement au cours des cinq années précédentes. Prenant en compte les critères mentionnés plus haut, l'analyse des charges microfilariennes a été faite sur 122 sujets du Mbam et 103 sujets du Nkam. Les nodules et vers adultes recueillis à J0 et inclus dans l'analyse provenaient de 188 sujets du Mbam et 143 sujets du Nkam. Les échantillons de J80 ont été obtenus chez 159 individus du Mbam et 128 du Nkam.

Evolution des charges microfilariennes

Dans la vallée du Nkam, parmi les 103 sujets suivis, 93, 95 et 97 ont été ré-examinés respectivement à J15, J80 et J180. La proportion de sujets présentant encore des mfs dermiques à ces différents temps de suivi était respectivement de 32,3%, 42,0% et 70,1% et les charges microfilariennes observées correspondaient respectivement à 2,3%, 2,1% et 16,3% des valeurs relevées à J0. Dans la vallée du Mbam, 116, 112 et 121 personnes, parmi les 122 éligibles, ont été revus à J15, J80 et J180. A ces temps de suivi, 19,8%, 41,1% et 76,9% des sujets présentaient encore des mfs et les charges microfilariennes observées alors correspondaient respectivement à 3,1%, 6,3% et 43,0% des charges à J0.

Les résultats obtenus à J180 peuvent laisser penser que les charges remontent plus rapidement chez les sujets du Mbam que chez ceux du Nkam. Deux points essentiels doivent cependant être soulevés. Tout d'abord, les charges à J0 des sujets du Mbam n'étaient pas à l'équilibre puisque ces patients avaient reçu de multiples traitements entre 1994 et 2006 : si on avait laissé ces individus sans traitement en 2007, leurs charges auraient probablement continué à augmenter. Par ailleurs, l'intensité de l'infection chez les sujets n'était pas tout à fait similaire : ainsi, au début de l'étude, le nombre moyen de nodules palpables était de 4,51 chez les patients du Mbam et de 3,50 chez ceux du Nkam. Ces considérations nous ont conduits à poursuivre les analyses en prenant en compte certains facteurs individuels.

Facteurs d'hôtes influençant l'évolution des charges microfilariennes

Les analyses concernant uniquement les données du Nkam ont révélé que les charges relevées à chaque temps de suivi (J15, J80 et J180) étaient positivement associées au niveau des charges initiales. Les analyses incluant simultanément les données des deux sites d'étude ont montré que l'âge des sujets avait un effet, assez faible, sur les charges relevées à J15. Mais le résultat le plus marquant était que les charges à J180 étaient très fortement associées au nombre de nodules palpables, donc au nombre de vers adultes hébergés par les patients. Après ajustement sur ces deux facteurs (âge et nombre de

nodules palpables), on constate que l'évolution des charges entre J15 et J80 ne diffère pas entre les deux sites. En revanche, entre J80 et J180, on observe que la remontée des charges est plus rapide chez les individus du Mbam que chez ceux du Nkam. L'analyse confirme également que le nombre de nodules palpables est positivement associé au niveau des charges après traitement.

Analyses sur les nodules et les vers adultes

Les 618 interventions effectuées chez les sujets inclus dans ces analyses ont permis de collecter 949 nodules renfermant 1049 vers mâles et 1786 femelles (calcifiées ou non). Des embryogrammes ont pu être réalisés pour 1438 femelles vivantes.

Dans le Nkam, le nombre moyen d'embryons par femelle (exprimé en UE) a augmenté de 115,2 à 182,7 entre J0 et J80. Ceci indique un blocage de la sortie des embryons hors de l'utérus des femelles. En revanche, dans le Mbam, ce nombre est resté stable entre les deux phases (139,7 et 143,7). Si on ne considère que les embryons viables, on note dans les deux sites une chute de leur densité entre J0 et J80 : elle passe de 97,9 à 72,2 UE dans le Nkam et de 88,5 à 52,1 UE dans le Mbam. Enfin, on constate que le nombre de mfs viables augmente nettement entre J0 et J80 dans le Nkam (29,2 et 51,0 UE) alors qu'il reste stable dans le Mbam (22,2 et 22,1 UE).

Les analyses multivariées indiquent que le nombre moyen d'embryons par femelle (ensemble des embryons, mfs viables seules ou mfs dégénérées seules) était fortement et positivement associé au nombre de vers mâles présents dans le nodule d'origine de la femelle ; cette association était retrouvée dans les deux sites et aux deux phases considérées (J0 ou J80). Par ailleurs, à J0, les femelles du Nkam contenaient significativement plus de mfs viables et moins de mfs dégénérées que celles du Mbam. A J80, le nombre de mfs dégénérées ne différait plus entre les deux sites. Le nombre de vers femelles dans le nodule, le nombre de nodules retrouvé au site d'intervention et le nombre de nodules palpables n'avaient aucune influence sur le contenu des utérus des vers.

Discussion

Les effets de l'IVM sur *O. volvulus* s'exercent à plusieurs niveaux et il est nécessaire de clarifier, pour chacun d'entre eux, la définition d'un phénotype de résistance.

Une résistance à l'effet microfilaricide se manifesterait par une baisse moins marquée des charges microfilarieuses dans les semaines suivant le traitement. Nos observations faites à J15 dans le Mbam indiquent que l'intensité de l'effet microfilaricide de l'IVM n'est pas altérée dans cette population de sujets multi-traités.

Nous avons utilisé deux méthodes pour investiguer l'intensité de l'effet embryostatique : l'étude de la remontée des charges entre J15 et J80-J180 (qui donne des informations au niveau de l'ensemble de la population parasitaire hébergée par un individu) et l'étude des embryogrammes confectionnés à J80 (qui informent sur le statut reproductif individuel des vers contenus dans un seul nodule, dont on fait l'hypothèse qu'ils sont représentatifs des parasites du patient). Concernant la rapidité de remontée des charges, nous avons montré pour la première fois qu'elle était influencée par certains facteurs individuels, notamment l'âge du sujet et surtout le nombre de nodules palpables, ce dernier étant corrélé avec le nombre de parasites hébergés par l'individu (17). Ces facteurs pourraient expliquer une grande part de la variabilité de la réponse à l'IVM, dont on n'a pris vraiment conscience que récemment (10). L'influence de ces facteurs pourrait expliquer les résultats obtenus par Osei-Atweneboana et al. (16) au Ghana et qui ont suscité un large débat dans la communauté scientifique concernée. En effet, une analyse détaillée des données de cette étude montre que les villages où la remontée des charges après traitement est la

plus rapide sont précisément ceux où la prévalence des nodules et donc, probablement, le nombre moyen de parasites hébergés par les individus, sont les plus élevés. La situation est similaire à celle dans laquelle on se trouvait dans les années 1990, quand des cas de mauvaise réponse au praziquantel ont été signalés au Sénégal chez des personnes infectées par *Schistosoma mansoni* et vivant dans des zones de forte transmission (11). Nous avons donc pris en compte l'âge et le nombre de nodules palpables dans notre analyse et montré que, même après ajustement, la remontée des charges était plus rapide dans la vallée du Mbam que dans la vallée du Nkam.

Les embryogrammes des vers collectés à J0 dans le Mbam indiquent que l'embryogenèse est peu altérée chez ces parasites, malgré des traitements répétés par IVM depuis 13 ans. Ce résultat était inattendu dans la mesure où l'on pensait que les traitements successifs entraînaient une baisse marquée de la fécondité des vers (9). Ainsi, chez les patients du Mbam, inclus dans une précédente étude, le pourcentage de femelles vivantes contenant des embryons viables avait chuté entre 1994 (avant le tout premier traitement) et 1997 (un an après trois traitements annuels) de 53,0 à 29,8% (13). Lors de la présente étude, les proportions relevées à J0 étaient de 45,2% dans le Mbam et de 51,3% dans le Nkam. Certes, à ce moment, la densité des mfs viables dans les utérus était moins élevée dans le Mbam que dans le Nkam et, par ailleurs, nos investigations indiquent que certains patients du Mbam n'ont pas reçu le traitement tous les ans depuis 1997. Toutefois, nos résultats suggèrent que l'effet indirect de l'IVM sur l'embryogenèse des vers femelles s'est atténué entre 1997 et 2007.

Par ailleurs, l'augmentation du nombre total d'embryons entre J0 et J80 dans le Nkam reflète un effet embryostatique normal de l'IVM. En revanche, une telle augmentation n'a pas été relevée dans le Mbam laissant penser que le phénomène de blocage du contenu utérin s'est amenuisé chez les vers femelles de ce site. Cette atténuation pourrait également expliquer pourquoi la densité de mfs normales est similaire entre J0 et J80 chez les femelles du Mbam, alors qu'elle a fortement augmenté au cours de la même période dans le Nkam.

En conclusion, plusieurs de nos résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle certains effets de l'IVM sur les capacités de reproduction d'*O. volvulus* tendent à diminuer après plus de 10 ans de traitements répétés. Il est cependant trop tôt pour parler de résistance. Nous avons montré que des facteurs individuels doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats concernant le phénotype de réponse au traitement. Le génotypage des parasites récoltés est en cours et devrait permettre de déterminer si le statut reproductif des femelles caractérisé par les embryogrammes est associé à un génotype particulier. Si tel était le cas, l'hypothèse de l'apparition d'une résistance d'*O. volvulus* à l'IVM se pourrait se confirmer. Les marqueurs génétiques identifiés devraient alors être utilisés au plus tôt sur toute l'aire du Programme africain de lutte contre l'onchocercose (OMS-APOC) afin d'identifier les régions où la résistance est déjà présente. Des stratégies visant à ralentir l'extension du phénomène devraient alors être mises au point, en utilisant les techniques de modélisation. Aucun autre traitement que l'IVM ne pouvant actuellement être distribué à large échelle contre l'onchocercose, une modification de la fréquence ou de la population-cible des traitements pourrait être envisagée.

Remerciements

Cette étude a été financée par l'Agence Nationale de la Recherche (projet ANR-06-SEST-32) et l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Nous remercions profondément les patients qui ont accepté de participer à ce travail ainsi que toutes les personnes qui nous ont aidés à le mener à Yaoundé ou sur le terrain. Notre gratitude va particulièrement à Monsieur le Ministre de la Santé publique du Cameroun, aux Docteurs Akono Emame, R. Atangana, X. Crespin, S. Efonle, Fifen Alassan, L. Fossouo, X. Garde, P. Nguipdop, M. Ntep et N. Tendongfor, à Mmes S. Kemleu et G. Kweban et à MM. J.P. Agbor, I. Behalal, J. Bopda, M. Esum, C. Evini, I. Jato, J. Kameni, D. Njombini, T. Ndapeyouone, L.P. Nguetsop, S. Nnouk et J. Ouafu.

Références

1. Ali MMM, Mukhtar MM, Baraka OZ, Homeida MMA, Kheir MM, Mackenzie CD, 2002. Immunocompetence may be important in the effectiveness of Mectizan[®] (ivermectin) in the treatment of human onchocerciasis. *Acta Trop* 84, 49-53.
2. Awadzi K, Boakye DA, Edwards G, Opoku NO, Attah SK, Osei-Atweneboana MY, Lazdins-Helds JK, Ardrey AE, Addy ET, Quartey BT, Ahmed K, Boatman BA, Soumbeay-Alley EW, 2004. An investigation of persistent microfilaridermias despite multiple treatments with ivermectin, in two onchocerciasis-endemic foci in Ghana. *Ann Trop Med Parasitol* 98, 231-249.
3. Basáñez MG, Pion SDS, Boakes E, Filipe JAN, Churcher TS, Boussinesq M, 2008. Effect of single-dose ivermectin on *Onchocerca volvulus*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 8, 310-322.
4. Basáñez MG, Pion SDS, Churcher TSC, Breitling L, Little M, Boussinesq M, 2006. River blindness: a success story under threat? *PLoS Med* 3, e371.
5. Bourguinat C, Ardelli BF, Pion SDS, Kamgno J, Gardon J, Duke BOL, Boussinesq M, Prichard RK, 2008. P-glycoprotein-like protein, a possible genetic marker for ivermectin resistance selection in *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 158, 101-111.
6. Bourguinat C, Pion SDS, Kamgno J, Gardon J, Duke BOL, Boussinesq M, Prichard RK, 2007. Genetic selection of low fertile *Onchocerca volvulus* by ivermectin treatment. *PLoS Negl Trop Dis* 1: 1-11.
7. Bourguinat C, Pion SDS, Kamgno J, Gardon J, Gardon-Wendel N, Duke BOL, Prichard RK, Boussinesq M, 2005. Genetic polymorphism of the beta-tubulin gene of *Onchocerca volvulus* in ivermectin naïve patients from Cameroon, and its relationship with fertility of the worms. *Parasitology* 132, 255-262.
8. Chavasse DC, Post RJ, Davies JB, Whitworth JAG, 1993. Absence of sperm from the seminal receptacles of female *Onchocerca volvulus* following multiple doses of ivermectin. *Trop Med Parasitol* 44, 155-158.
9. Chavasse DC, Post RJ, Lemoh PA, Whitworth JAG, 1992. The effect of repeated doses of ivermectin on adult female *Onchocerca volvulus* in Sierra Leone. *Trop Med Parasitol* 43, 256-262.
10. Churcher TS, Pion SDS, Osei-Atweneboana MY, Prichard RK, Awadzi K, Boussinesq M, Collins RC, Whitworth JA, Basanez MG, 2009. Identifying sub-optimal responses to ivermectin in the treatment of river blindness. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 16716-16726.
11. Danso-Appiah A, De Vlas SJ, 2002. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. *Trends Parasitol* 18, 125-129.
12. Duke BOL, Zea-Flores G, Muñoz B, 1991. The embryogenesis of *Onchocerca volvulus* over the first year after a single dose of ivermectin. *Trop Med Parasitol* 42, 175-180.
13. Gardon J, Boussinesq M, Kamgno J, Gardon-Wendel N, Demanga-Ngangue, Duke BOL, 2002. Effects of standard and high doses of ivermectin on adult worms of *Onchocerca volvulus*: a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 203-210.
14. Kaplan RM, 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20, 477-481.
15. Kläger S, Whitworth JAG, Post R, Chavasse DC, Downham MD, 1993. How long do the effects of ivermectin on adult *Onchocerca volvulus* persist? *Trop Med Parasitol* 44, 305-310.
16. Osei-Atweneboana M, Eng JKL, Boakye DA, Gyapong JO, Prichard RK, 2007. Prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* infection and efficacy of ivermectin in endemic communities in Ghana: a two phase epidemiological study. *Lancet* 369, 2021-2029.

17. Pion SD, Grout L, Kamgno J, Nana-Djeunga H, Boussinesq M. Individual host factors associated with *Onchocerca volvulus* microfilarial densities 15, 80 and 180 days after a first dose of ivermectin. Acta Trop, in press.
18. Schulz-Key H, 1990. Observations on the reproductive biology of *Onchocerca volvulus*. Acta Leiden 59, 27-43.