



HAL
open science

Evaluation in vitro de l'effet de la granulation sur les propriétés AH de TC issus de plantes tropicales

Manuella Constant

► **To cite this version:**

Manuella Constant. Evaluation in vitro de l'effet de la granulation sur les propriétés AH de TC issus de plantes tropicales. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-02796411

HAL Id: hal-02796411

<https://hal.inrae.fr/hal-02796411>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

ANNEE 2015-2016



EVALUATION in vitro de l'effet de la granulation sur les propriétés AH de TC issus de plantes tropicales.

Présenté par CONSTANT Manuella pour l'obtention du MASTER EN SCIENCES, TECHNOLOGIES ET SANTE

DISCIPLINE : BIOLOGIE-SANTE

Stage effectué au sein de l'Unité de Recherches Zootechniques de l'INRA Domaine de Duclos Petit-Bourg.

Responsable de stage INRA : Dr Carine MARIE-MAGDELEINE

Responsable de stage UAG : Dr Olivier GROS

Soutenue le 27 Juin 2016

Remerciements

J'exprime tout d'abord toute ma profonde gratitude à ma famille, qui a toujours été là pour moi, à mon écoute et pour leur soutien physiquement et moralement et surtout pour leur confiance à mon égard...Merci beaucoup

J'adresse mes remerciements à Mr Harry Archimède de m'avoir accueillie au sein de son unité.

Je remercie particulièrement Mme Carine MARIE-MAGDELAINE mon maître de stage pour son encadrement, ses conseils pour la rédaction de ce rapport, et surtout de sa gentillesse.

Mes remerciements vont à Mr Gros, le responsable du master pour m'avoir orienté vers l'INRA.

Je remercie toute l'équipe de l'Unité de Recherche Zootechnique de l'INRA ainsi le personnel de laboratoire : Yoann FELICITE, Suzitte CALIF, Dalida..... , Tatatiana ETIENNE et Lucien PHILIBERT.

Un grand merci à tous les thésards et stagiaires pour l'ambiance chaleureuse également toutes les personnes qui de près ou loin, ont participé au bon déroulement de mon stage.

Liste d'abréviations

TC : Tanin condensé

LDA : Test de Développement Larvaire

LEIA : Test d'Inhibition de Dégainement Larvaire

PBS : Phosphate Buffer Sample

H.contortus : Haemonchus contortus

SIG: Strongle gastro-intestinal

Liste des illustrations

Figure 1 : Cycle biologiques du nématode

Figure 2 : Structure chimique de l'acide gallique

Figure3 : Structure chimique de l'acide éllagique

Figure 4 : Structure chimique des TC

Figure 5 : Feuille de Manihot esculenta

Figure 6 : Feuille de Leucena

Figure 7 : feuille : Cajanus Cajan

Figure 8 : Schémas de protocole du broyage des granulés

Sommaire

Remerciement	2
Liste des abréviations	3
Liste d'illustration.....	4
I) Introduction.....	7
II) Revue Bibliographique.....	8
Le parasite Haemonchus contortus.....	8
Phytothérapie.....	9
Tanins Condensés.....	10
Facteurs influençant les TC.....	12
Plantes testées.....	13
Manihot esculenta (Manioc)	13
Leucaena Leucocephala (Leucena).....	14
Cajanus cajan (Pois d'angole).....	15
Test in vitro.....	16
III) Matériels et Méthodes.....	17
Matériels.....	17
1- Matériel Biologique.....	17
2- Matériels végétales.....	17
Méthodes.....	18
1. Préparation et Broyage des granulés.....	18
Etape de l'extraction.....	20
Etape de la purification	21
2. Tests Anthelminthiques in vitro.....	22
Test de développement larvaire (Larval development Assay, LDA)	22
Test de dégainement (Larval Exsheathment Assay).....	23
Analyses Statistiques.....	24

IV) Résultats.....	25
Tests anthelminthiques in vitro.....	25
Test de développement larvaire (LDA.....	28
Test de dégagement larvaire (LEA)	29
V) Discussion.....	32
Conclusion.....	34
Résumé.....	35
Summery in English.....	36
Références Bibliographiques.....	37

D INTRODUCTION

Dans le monde entier, le parasitisme gastro-intestinal par les strongles digestifs ou strongles gastro-intestinaux (SGI), affecte la santé animale et a un impact négatif sur la productivité globale des troupeaux. Selon FAO (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), ces maladies parasitaires sont l'une des contraintes les plus importantes. Parmi les strongles, le parasite *Haemonchus contortus* (prévalence 100% dans la zone Caraïbe) est à l'origine d'une baisse importante des performances des élevages de petits ruminants.

7

Depuis quelques années, le seul moyen de lutte contre ces parasites est l'utilisation de médicaments vermifuges chimiques. Cependant, plusieurs problèmes se posent quant à leur utilisation: Premièrement, au cours de ces dernières années un usage excessif et considérable de ces vermifuges, a conduit à l'apparition croissante de souches de parasites résistantes aux vermifuges de synthèse (Paolini et al 2004). De plus, les consommateurs se montrent de plus en plus réticents à l'emploi de molécules chimiques en élevage, craignant la présence de résidus dans les produits animaux viande et lait.

Le développement de ces résistances et les différentes pressions des consommateurs amènent à se poser la question sur une réduction de l'utilisation de substances chimiques dans le secteur de l'élevage et à inciter une recherche active de solutions alternatives ou complémentaires à la chimiothérapie pour le contrôle du parasitisme gastro-intestinal (Hoste and Torres-Acosta, 2011).

Parmi ces nouvelles approches, l'utilisation possible des plantes bioactives, riches en métabolites secondaires (substances actives présentes dans les plantes) a été identifiée comme une option intéressante pour moduler la biologie des nématodes et par conséquent contrecarrer les conséquences négatives pour l'hôte.

Des études ont évoqué que les métabolites secondaires tanins condensés (TC), pouvaient altérer le cycle des strongles et présenter un effet anthelminthique (Paolini et al. 2003 ; Brunet et al., 2008a; Marie-Magdeleine et al. 2010).

L'Unité de Recherche Zootechnique (URZ) de l'INRA de Duclos (Petit-Bourg) travaille à la mise au point de granulés ayant des activités anthelminthiques à partir de ressources végétales contenant des TC.

L'objectif de cette étude est d'évaluer *in vitro* l'effet anthelminthique de granulés pour animaux (individuels ou mélange) fabriqués à base de 3 plantes contenant des TC: Manioc, Leucena, Poids Angole. Pour cela les extraits de TC des granulés seront évalués sur le développement larvaire L1 à L3 et le dégainement larvaire de la larve de stade L3 (larve infestante) du parasite *H.contortus*.

II) Revue Bibliographique

1. Le parasite *Haemonchus contortus*

Les nématodes parasites du tube digestif des ruminants sont communément appelés « strongles ou nématodes gastro-intestinaux ». Ils appartiennent à l'ordre des Strongyloidea et à deux familles: les Trichostrongyloidea (*Trichostrongylus* et *Haemonchus*) et les Strongyloidea (*Oesophagostomun*).

Les strongyloses gastro-intestinales sont une des pathologies majeures chez les ruminants élevés à l'herbe. Dans les zones tropicales, l'espèce la plus répandue et très pathogène au sein des petits ruminants est le *H. contortus*. Toutefois on peut retrouver dans l'élevage *T. colubriformis* ainsi que *l'oesophagostomun columbianum*.

Haemonchus contortus, communément appelé « le ver de poteau de barbier » a été trouvé en Afrique, au Pays bas, en Asie, et en Europe Il s'adapte à des conditions allant des zones tropicales aux régions montagneuses. Toutefois, il est plus répandu dans les zones humides.

Ce parasite nématode est un problème clinique pour les animaux (Maria Lenira Leite-Browning, 2006). Il impacte négativement les performances zootechniques (ingestion, digestion, croissances...) et affecte la santé et le bien-être des animaux en provoquant l'anémie, anorexie, trouble digestifs En raison des pertes de production majeures qu'il entraîne, sa présence perturbe à la fois la qualité des produits ainsi que la quantité

Le cycle biologique du *Haemonchus contortus* est monoxène c'est-à-dire un seul hôte. Il comprend deux phases :

- une phase libre dans le milieu
- une phase parasitaire chez l'hôte. (Voir Figure 1)

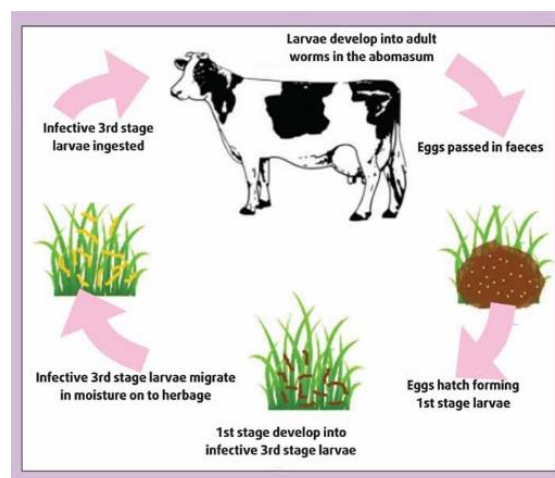


Figure 1 : Cycle biologique du nématode

- Phase libre

La phase exogène des SGI commence lorsque la femelle pond des œufs infectés. Les œufs sont dispersés au sein du pâturage. Lorsque les conditions environnementales sont favorables (température de 24 à 29°C), les œufs éclosent et libèrent des larves de stade 1 (L1s). Près de 24 à 48 heures après l'apparition du stade L1, une première mue a lieu et les larves deviennent des larves L2. Deux à quatre jours après, des larves infectantes L3 apparaissent suite à une autre nouvelle mue. Elles migrent vers le sommet des brins d'herbes. (thèses de QUIJADA Jessica 2015)

- Phase parasitaire

Elle débute par l'ingestion des L3 par l'hôte. Ces larves possèdent une gaine protectrice qui premièrement leur permet de survivre dans le milieu et deuxièmement d'être protégé lors de leur passage dans le tractus digestif. Une fois avalées, les larves L3 transitent dans le tube digestif jusqu'à l'estomac du ruminant (caillette). Dans le tube digestif, les L3 se libèrent d'abord de leur gaine et finissent de la perdre pendant leur migration. Dégainées, elles pénètrent ensuite dans la muqueuse digestive ou elles muent en L4. (Thèses de QUIJADA Jessica 2015)

Au cours de quatre à six jours suivants, la larve L4 évolue en larve juvénile au stade L5. Une semaine après, les adultes sexués apparaissent. (Sendow, 2003)

2. La phytothérapie

La phytothérapie est une médecine qui utilise des plantes (ou la «partie active» de ces plantes) ayant des propriétés thérapeutiques. L'utilisation des plantes thérapeutiques remonte à l'antiquité et peut être même bien avant. Depuis des siècles, les plantes ou leurs extraits sont utilisées en médecine traditionnelle afin de traiter toutes sortes de pathologies.

Une des originalités majeures des végétaux, réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, lipides, acides nucléiques...), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires. Ce qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire.

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas directement impliquées dans le processus de croissances des organismes vivants, contrairement aux métabolites primaires. Ils appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes, terpènes, composés phénoliques...) qui sont inégalement répartis chez les végétaux. Les métabolites secondaires sont associés à la défense de la plante contre les insectes, les micro-organismes y compris les bactéries, les champignons et les virus, la défense contre d'autres plantes en compétition pour les nutriments et la lumière, la protection contre l'effet néfaste des ultraviolets.

Parmi ces métabolites, les polyphénols ou composés phénoliques, qui regroupent des milliers de molécules, un nombre qui augmente et qui en fait un groupe chimique particulièrement important.

3. Les tanins condensés

Selon la définition d'un chimiste Edgar Charle Bate-Smith (1973), les tanins sont des composés poly-phénoliques hydrosolubles de structure très variée (Thèse de Jessica QUIJADA 2015). Certains possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et hypoglycémiantes. D'ailleurs, ce sont de puissants anti-oxydants.

Chimiquement, les tanins sont des métabolites secondaires que l'on retrouve chez les végétaux supérieurs. Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins différents à la fois par leur réactivité chimique et par leurs composition (Bruneton, 1999. V.PAOLINI et al 2004) : **les tanins hydrosolubles, et les tanins condensés.**

- Tanins hydrolysables

Responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes. Ce sont des poly esters d'un sucre, en générale le glucose et des molécules d'acide-phénol.(thèse de C.Magdelaine, 2009). Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique. Ils libèrent une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être de l'acide gallique. (Voir Figure 2) . Ou soit un dimère de ce même acide : l'acide éllagique(Voir Figure 3)

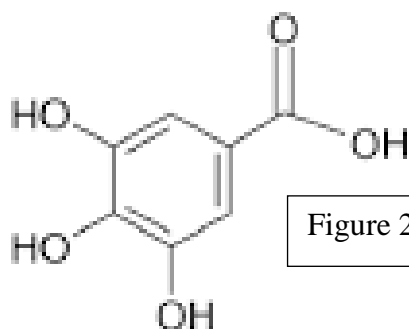


Figure 2 : Acide gallique

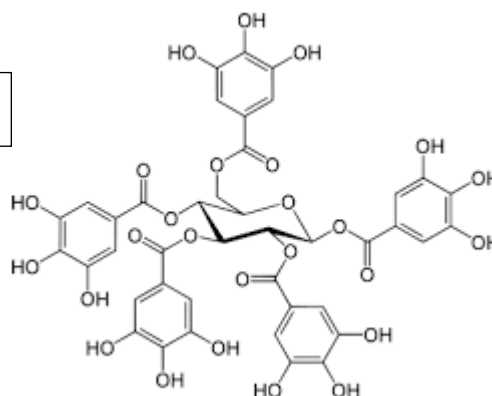
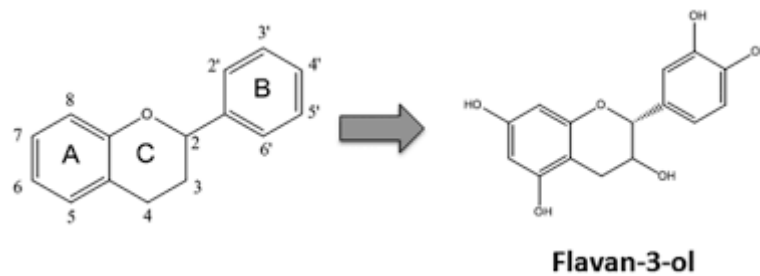


Figure 3 : Acide éllagique

- Tanins condensés

Aussi appelé proanthocyanidols ou tanins catéchines sont des polymères de flavane-3-ols. Moins toxiques, ne traversant pas la barrière intestinale. Ce sont des polyphénols qui appartiennent à la famille des flavonoïdes. Quelqu'un des flavonoïdes coopèrent dans la croissance, le développement des plantes, leurs protections contre les UV et contre aussi des attaquants (insectes, champignons...)



11

Des recherches sur une consommation des TC élevée (< 7% de matière sèche) sont caractérisées par une interférence de morphologie de l'animal (telle la réduction de la prise alimentaire..... Cependant une consommation faible voir modéré des TC (> 6% MS) ont eu des effets positifs sur les herbivores par exemple sur l'augmentation de la croissance, de la production de lait. (Min et al. 2003). Des effets positifs sont par la suite observés. Cela résulte d'une réaction chimique par lesquels des petites molécules réagissent entre elles c'est-à-dire les molécules à fonction phénol pour former un complexe de molécule de masse moléculaires plus élevées. Ce qui protège les protéines alimentaires de la dégradation dans le rumen et par conséquent, augmente la disponibilité des protéines dans le tube digestifs. (Hoste et al., 2006; Min et al., 2003).

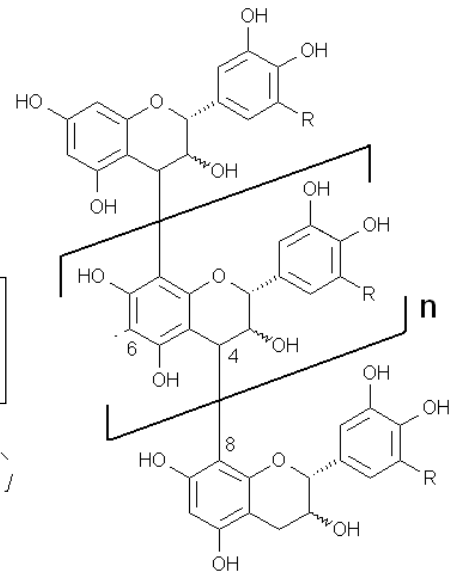
Les tanins condensés sont très abondants dans certains végétaux, par exemple la pomme, prune, fraise....et dans des boissons fermentés ou non (thé, cidre...)

La structure chimique des TC révèle plusieurs groupements hydroxyles (OH) et phénoliques qui leur confèrent la particularité de former des complexes avec des macromolécules comme des protéines, les glucides (des hydrates de carbones)....

Les TC sont liées entre elles par des liaisons de type carbone-carbone. Ils peuvent présenter soit une structure linéaire (uniquement des liaisons C4-C8). Par exemple les TC des grains de sorgho. Ou soit une structure branché (liaison C4-C8 et C4-C6). Par exemple les TC du quebracho

Cependant, il existe un second type de liaison de type A qui fait intervenir à la fois une liaison C4-C8 et une liaison C2-O-C7 entre deux monomères. (Voir Figure 4). (Thèse de Jessica QUIJADA 2015)

Figure 4 : Exemple de structure de tanins condensés (Macheix et al 2005)



4. Les facteurs influençant la composition des tanins condensés

Pendant de nombreuses années les composées phénoliques des végétaux ont été le centre de recherches scientifiques. Plusieurs facteurs environnementaux tel que la température, la sécheresse,peuvent affecter gravement le métabolisme phénolique c'est-à-dire les TC contenus dans ces ressources végétales.(Rapport de liza Dahomé , 2014),(thèses Erik Braastad Mallea 2010).

- La température

Cohen et al 2008 ont mené une étude sur l'impact de la température sur le métabolisme phénolique des fruits. Une température plus élevée peut entraîner une accumulation des anthocyanes et des variations au sein de leur composition. Cas contraire une très forte température, les composées sont détériorer et par conséquent, une diminution de leur concentration.

- La sécheresse

Fernandes de Olivera et al de 2013, on fait une étude sur un manque d'arrosage. Des traitements ont été faits sur des plantes : un arrosage de 50% et 25%, un séchage partiel, et un séchage complet 100% qui servait de témoins. Au cours de cette étude, il a été montré que les plantes qui ont reçu une évapotranspiration de 25% et une irrigation partielle, la concentration d'anthocyanes étaient plus élevées.

L'humidité, l'intensité lumineuse, la composition du sol sont également des causes qui peuvent augmenter le taux de TC dans les plantes.

5. Les plantes testées

Nous avons étudiées le Manioc, Leucena, Pois Angole . Ces plantes ont été sélectionnées non seulement pour leurs répartitions et leurs disponibilités sur le territoire des Antilles, mais aussi pour leur teneur en TC.

✚ Le manioc : *Manihot esculenta*

De son nom scientifique *Manihot esculenta*, le manioc est appelé « cassava », « yucca ».

Appartenant à la famille des Euphorbiaceae, elle est d'origine d'Amérique du Sud.

Quatrième production végétale au monde, le manioc est utilisé pour l'alimentation humaine mais aussi pour les animaux, on emploie le manioc sous forme d'amidon et également pour la production de l'éthanol. Sa production mondiale en 2009 est d'environ 250 millions de tonnes par ans. En Amérique latine et aux Caraïbes, la production est autour de 35 millions de tonnes par ans, ce qui représente près de 20% de l'offre mondiale.



Figure 5 : Feuille de manioc

Plusieurs plantes contiennent ou accumulent diverses substances chimiques qui sont toxiques pour les animaux. C'est le cas du manioc. Dans toutes les parties de la plante, il existe en quantité variables un composé chimique principale très toxique appelé « linamarine ». Il peut coexister avec son homologue appelé la « lotaustraline » étant bien évidemment toxiques. La linamarine est un glucoside cyanogénétique qui est transformé en acide cyanhydrique toxiques lorsqu'il est en contact avec une enzyme « linamarase » qui est libéré au niveau des racines du manioc. En fonction de leurs teneurs en glucosides cyanogènes, le manioc se déclinera en plusieurs variétés classées selon leur toxicité :

Les variétés de manioc sont divisées en deux groupes :

Les variétés amères (*Manihot utilissima*) : qui contiennent du cyanure dans les racines (de 0.02 à 0.03% de MS) mais également dans les feuilles (jusqu'à 0.2% de MS)

Les variétés douces (*Manihot opi*) : leur teneur en cyanure est plus faible (moins de 0.01% de MS dans les racines et environ 0.1% pour les feuilles fraîches). (Magdelaine et al 2015)



Figure 6 : Feuille de leucena

🚩 Leucena : *Leucena leucocephala*

Anciennement connu sous le nom de *L. glauca*, la leucena fait partie de la famille des *Fabaceae*. Originaires d'Amérique Centrale, elle a été introduite dans l'ensemble des tropiques humides ou subhumides. Depuis les années 70 et 80 cette plante est connue comme « l'arbre miracles » grâce à son fourrage à long terme et très nutritifs très riche en protéines (21-26% de MS) et une teneur assez élevée en fibres (15-25% de cellulose brute/MS)

Ainsi que du fourrage, la leucena est utilisée pour faire du charbon, elle peut fournir du bois de chauffage, de l'engrais vert et permet le contrôle de l'érosion.

Même si, le feuillage de la leucena est très nutritif, et est une source importante de tanin (10.15mg/g), toutefois elle contient un nombre de constituants toxiques qui peuvent gravement limiter son utilisation dans l'élevage. Ce toxique est un acide aminé: Le Mimosine avec un pourcentage allant jusqu'à 12% de MS pour les jeunes pousses. (C.Magdelaine et al 2015). Bien que très toxique pour les animaux non ruminants (chevaux, porc), le mimosine est décomposée par des microbes dans le rumen en 3,4 dihydroxypyridine composé non toxique. (Monoi K. Ghosh et al 2007)

✚ Le Pois d'angole : *Cajanus Cajan*

Cajanus Cajan en français pois d'angole appartient à la famille des Fabaceae. Sixième dans la production mondiale, *cajanus cajan* est une légumineuse fourragère à grosse graine originaire de l'Inde et cultivée dans les zones tropicales semi-arides et subtropicales. Il est une source importante de protéines. La plante est utilisée pour un usage médicinal vermifuge. (C. Magdelaine et al 2015).



Figure 6 : Feuille pois angole

Les feuilles de pois d'angole sont les organes les plus riches où l'on retrouve des flavonoïdes. Ils contiennent également des saponines, des tanins et des quantités de sucres réducteurs, des terpènes (Pal et al 2011). Les racines, les tiges, et les graines contiennent des isoflavonoïdes (formononétine, génistéine, cajénine, cajanol), (Nix et al 2015), il contient de l'acide hexadécanoïque, longistylin A, C qui confère une activité anticancéreuse. Présence de cajanuslactone qui est une coumarine qui confère une activité antibactérienne (Pal et al 2011).

D'autres études scientifiques faites sur le pois d'angole *Cajanus Cajan* montrent d'autres activités biologiques et pharmacologiques

- Activité anti-paludisme : molécule responsable : 2,6 dihydroxy-4-méthoxy chalcone c'est un Cajachalcone (E.O. Ajaiyeoba et al 2013)
- Antioxydant naturel dans le traitement de l'ulcère gastrique (Mohammad Mansoor et al 2015)

6) Les Tests in vitro

Afin de mettre en évidence l'effet de la granulation sur l'effet anthelminthique des TC, deux types de tests in vitro ont été réalisés: l'un touchant une étape du développement du parasite dans l'hôte: le dégainement de la larve L3 (LEIA); et l'autre ciblant une partie du développement du parasite hors de l'hôte : le développement larvaire du stade L1 au stade L3 (LDA)

- Test de développement larvaire (LDA)

Technique décrite par Hubert et Kerboeuf, 1992. Vet .Rec.130, 442-446). L'objectif est de tester in vitro l'effet de TC purifiés sur le développement larvaire du stade L1 à L3. Effectivement, les TC étant très peu digérables, ils se retrouvent dans les fèces et donc pourraient empêcher le développement des larves L1-L2 vers le stade infestant L3.

- Le test de dégainement (LEIA) des larves L3.

Technique décrite par (Bahuaud et al. 2006) .Elle a pour objectif de tester l'effet des TC sur le dégainement des larves L3 de *H.contortus*.

III) Matériels et Méthodes

1) Matériel biologique

Larves infestantes L3

Dans le cadre de notre étude, nous travaillons sur les souches sensibles aux anthelminthiques, qui proviennent du site de l'INRA de Gardel (Le Moule)

Afin de produire ces larves, 6 moutons de race de Martinik, de phénotype Black Belly ont été infestés expérimentalement par le parasite *H. contortus*, à raison de 10000 larves L3 par animal. Les fèces des animaux ont été recueillies 21 jours post-infestation. Une partie est mise en culture afin de produire les larves de stade L3 (coproculture). Une autre partie des fèces est traitée afin d'en extraire les œufs.

2) Matériel végétal

L'unité de Recherche de Zootechnique de l'INRA a fabriqué des granulés pour animaux à partir des feuilles des 3 espèces végétales: manioc, leucena, et pois d'angole. Les plantes ont été récoltées sur 2 zones de Guadeloupe (grande terre et basse-terre), à raison de 3 échantillons par zone. Les échantillons ont été préalablement séchés sous serre avant d'être granulés.

Afin de réaliser les essais, pour chaque plante les échantillons ont été poolés (en quantités égales pour chaque zone) afin de constituer un seul échantillon par plante granulée.

D'autre part, 3 plantes lyophilisées (témoins positifs) :

Parallèlement, 2 échantillons mélanges ont été constitués : un mélange des granulés des 3 plantes et un mélange des extraits de TC des 3 plantes (en quantités égales de chaque échantillon)

Les échantillons de granulés sont soumis à une extraction de TC.

Au total, 8 échantillons seront analysés :

4 témoins positifs :

Extrait de TC plante Manioc : pmanioc

Extrait de TC plante Leucaena : pleucaena

Extrait de TC plante Pois d'angole : ppois angole

Extrait de TC mélange des 3 plantes : pmélange

4 échantillons :

Extrait de TC granulé Manioc : gmanioc

Extrait de TC granulé Leucaena : gleucaena

Extrait de TC granulé Pois d'angole : g pois angole

Extrait de TC mélange des 3 granulés : g mélange

❖ Méthodes

🌈 Préparation et Broyage des granulés

Peser environ 12 g chaque granulés de plantes (3 lots pour chaque plantes : Leucéna, Manioc doux et amer, pois d'angole).

Pour chaque lot de granulé, nous avons fait un mélange et qu'on a écrasé au mortier. Nous décidons d'écraser les granulés avec un mortier afin de ne pas détériorer les TC présents dans les granulés.

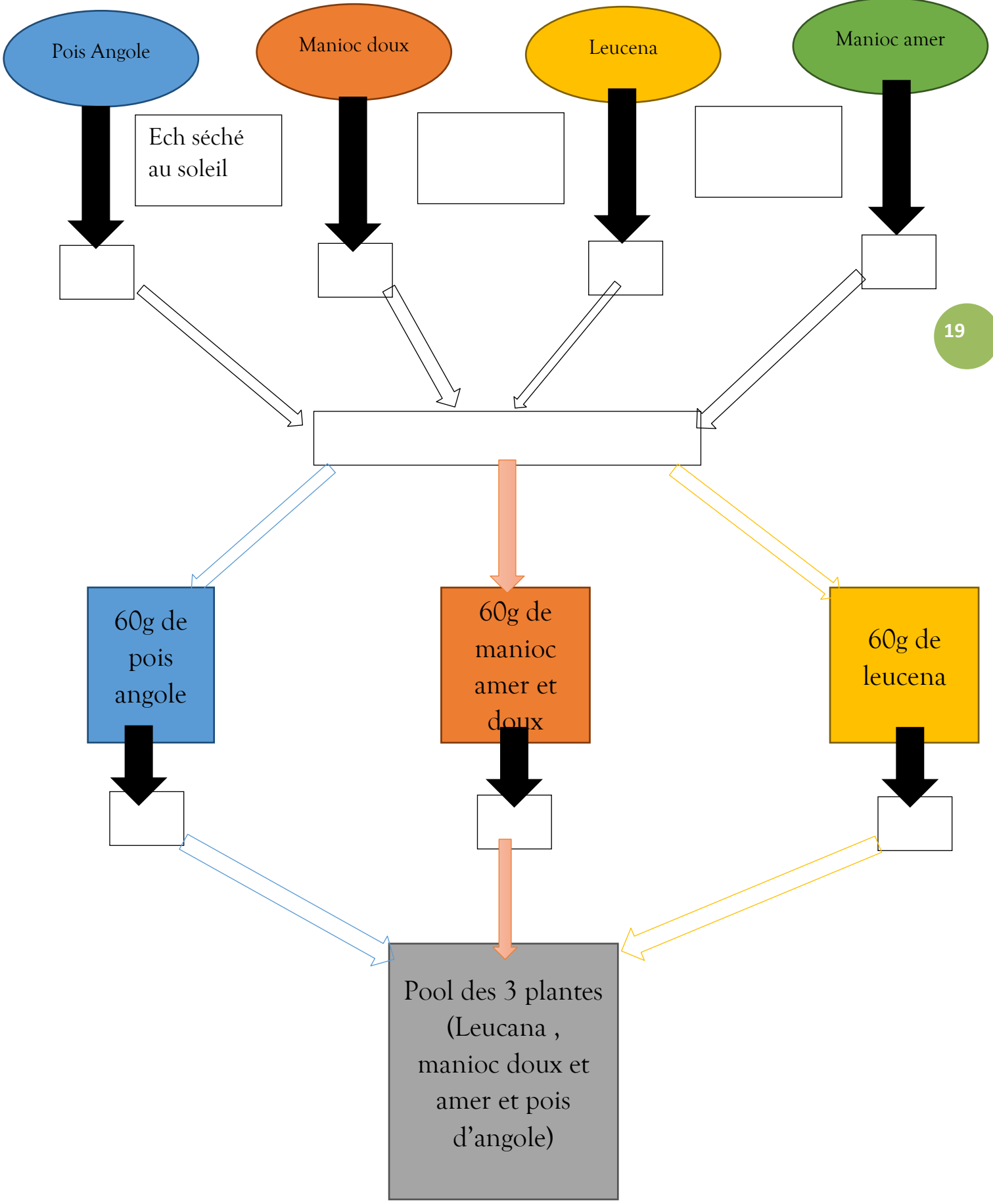
A l'issue de ce broyage au mortier, nous avons mélangé les différents lots de chaque granulé de chaque plante. Dans des pots, nous récupérons 60g de chaque granulé de plante. (Leucena, Manioc doux et amer, Pois d'angole).

Par la suite, nous avons fait un pool c'est-à-dire un mélange des 3 granulés de plantes faite précédemment en prenant 10 g dans les 60g de chaque pot.

Les différents pots soit 4 pots au total ont été conditionné dans la chambre froide en attendant l'étape de l'extraction.

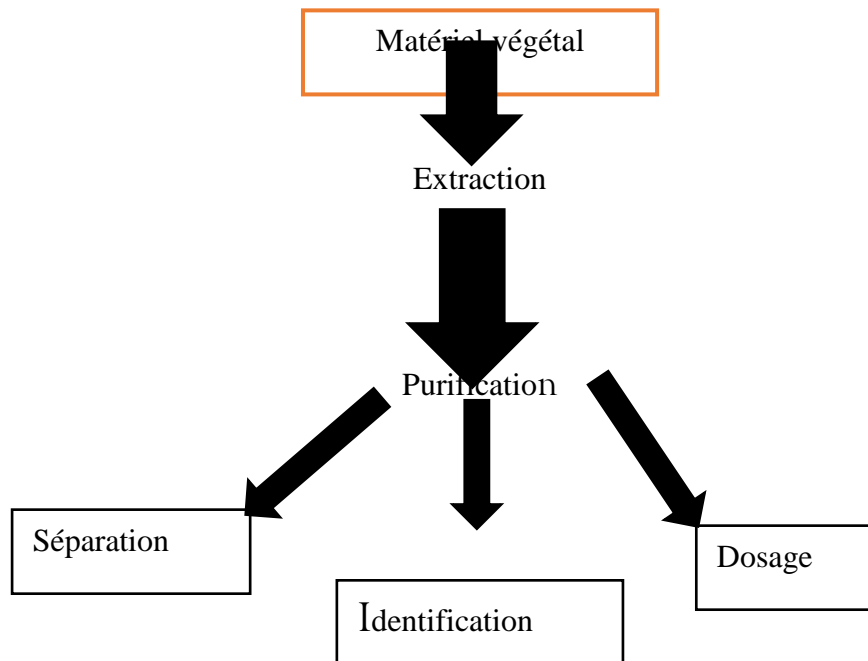
Matériels nécessaires

- Les granulés (3 lots pour chaque plantes : Leucéna, Manioc doux et amer, pois d'angole)
 - Une balance
 - Un mortier
 - Et des pots de conditionnements
- ✓ Protocole



Etape de l'extraction

L'objectif de l'extraction est de libérer les composés phénoliques présents par rupture du tissu végétal. L'extraction liquide-liquide est les techniques les plus utilisées pour l'extraction des polyphénols à partir des plantes naturelles.



Matériels utilisés

- Les poudres de chaque granulé
- Terre de diatomée
- ASE
- Evaporateur rotatif

✓ Protocole

Nous pesons 25 g de chaque granulé de plante + 6.5g de terre de diatomée. On introduit ce mélange dans une cellule. Ensuite on place le corps central de la cellule dans un automate appelée Accélération Solvant Extraction(A.S.E). Cet appareil permet d'extraire des composés organiques présents dans les échantillons. Il l'utilise l'effet combiné d'une température élevée et de la pression afin d'isoler les composés d'intérêt, tout en conservant l'intégrité de l'échantillon. Nous programmons l'extraction pour 1h.

Les polyphénols sont facilement oxydables, c'est pour cela qu'il est recommandé de travailler à une température de 0 à 4°, et d'assurer une protection en ajoutant un agent réducteur (acide ascorbique) au milieu d'extraction. D'autres facteurs tels que le pH, la température, le temps etc... jouent un rôle important dans la procédure d'extraction.

Après la fin de l'extraction, nous récupérons le filtrat que l'on transvase dans une ampoule à décanté. Dans l'ampoule, on rajoute 100ml d'éther diéthylique qu'on agite. Nous constatons

qu'il y a deux phases : une phase supérieure qui contient les lipides et les pigments, et une phase inférieure de couleur marron.

On récupère la phase inférieure, que l'on transfère dans des tubes. Ces tubes sont mis à évaporer à 38°C pendant 30mn afin d'éliminer les traces de solvants. Une fois la totalité du solvant évaporée, on obtient un extrait aqueux de tanin.

En générale, l'extraction des tanins est réalisée par un mélange d'eau et d'acétone. Après élimination de l'acétone par distillation, il est ensuite nécessaire de purifier l'extrait obtenu (la solution aqueuse) en se débarrassée des pigments et des lipides par un solvant (éther de pétrole). Une extraction de cette solution aqueuse par de l'acétate d'éthyle permet de séparer les proanthocyanidols et la plupart des tanins gallique.

Etape de la purification

Matériels servi

- *Fiole à vide*
- *Colonne de séphadex*
- *Extrait aqueux de tanins obtenus dans l'étape de l'extraction*

Préalablement, la colonne de séphadex a été préparée pour chaque plantes. Dans une fiole à vide, on coule le mélange (colonne de séphadex + méthanol à 50%) sur le creuset filtrant.

On réunit tous les tubes qui contenaient les extraits aqueux de tanin en un seul tube, et avec un autre tube on prend le même volume de méthanol. Ensuite on réunit à nouveau l'extrait de tanin + le méthanol dans un même tube.

On fait passer l'échantillon (les TC et le méthanol) sur le mélange (colonne de séphadex+ méthanol 50%). On rince l'échantillon 2 ou 3 avec du méthanol et on récupère l'échantillon dans des tubes.

On rince le gel avec de l'acétone à 70% pour pouvoir décroché les TC qui ont été accrochés sur le gel.

On collecte l'ensemble des TC dans des tubes que l'on va évaporer à l'évaporateur rotatif pour éliminer l'acétone. Après évaporation, on fractionne les TC dans des pots qui seront congelé en attendant la lyophilisation.

Tests Anthelminthiques in vitro

- TEST LDA

Extraction des œufs

Les œufs sont extraits après broyage des fèces, puis tamiser avec différents taille de tamis (500, 250, 125, 63,50 et 32 μ m). Ensuite, ils sont centrifugés pendant 15mn à 2800 tours/min. Le surnageant est éliminé et on rajoute une solution de NaCl de densité 1.2. L'ensemble est à nouveau centrifugé pendant 15 mn à 3000 tours/min. Un anneau d'œuf se forme et il est ensuite récupéré sur un tamis de 32 μ m, puis rincer abondamment avec de l'eau distillée.

La suspension d'œufs est ensuite distribuée dans des boites de 24 puits à raison de 0.5ml de solution d'œufs à 400 œufs / mL par puits.

La mise en culture des œufs

Les œufs sont mis en culture à température ambiante pendant 48h. Théoriquement c'est le temps nécessaire afin que les œufs éclosent. Toutefois cela peut changer d'un endroit à l'autre. Suite à cette incubation, les œufs qui ont évolué en larves (L1 et L2) ont été placés dans un milieu favorable à leurs développements et à leurs survis. On y a rajouté dans les puits : 22.5 μ l d'E. Coli (servira de nutriment aux larves), 9 μ l de Fungizone (antibiotique qui empêche le développement des champignons, et un milieu Earle qui servira également de nutriment. Ce milieu nutritif est rajouté dans chaque puits

Une fois que tous les œufs ont évolués au stade de larve L1 et L2, ont répartie 0.5ml des différents extraits de granulées et les extraits de plantes dans chaque puits à différentes concentrations 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 mg/mL.

Nous travaillerons sur les extraits de granulées. Evidemment, le PBS constituera notre témoin négatif, et les extraits de plantes constitueront notre témoin positif. Cinq répétitions ont été exécutées pour chaque dose de TC.

Les larves ont été incubées pendant huit jours à température ambiante (25 ° C), afin de permettre le développement des larves de la première phase (L1) à la troisième phase (L3). Par la suite, 20 μ l de solution de Lugol iodine ont été ajoutés à chaque puits et le nombre de larves a été dénombré en utilisant un microscope grossissement x30 en distinguant les larves infestantes L3 des larves L1-L2.

Comptage et calculs des larves L3

Le pourcentage de développement a été calculé comme suit : nombre de larves L3 par puits / total L1-L2-L3.

Tout au long du test, il faudra montrer l'efficacité des granulées par rapport au témoin PBS mais aussi montrer les différences entre les deux traitements (granulées et plantes).

- Test LEIA

Une solution larvaire à 2000 L3/mL a été soumise au processus artificiel de dégainement par mise en contact avec une solution de NaCl 16,6% et d'eau de Javel.

❖ Mise au point du test de dégainement

L'objectif de cette mise au point est de trouver la concentration de NaCl qui favorisera un dégainement total des laves théoriquement de 100%.

Nous travaillons avec les laves sensibles : la souche pompilus.

Lancement du test de dégainement par une mise au point

✚ Préparation de la solution NaCl/Javel

2 ml de NaCl + 2ml de Javel

✚ Préparation de la dilution 1/175^{ème}

Dans un tube cristallisé, nous avons mis 600µl de NaCl /Javel au 1/120^{ème} puis nous ajoutons sous agitation 600 µl de larves à 2000 larves/ml. Dans le dernier tube, ajouter 750 µL de PBS et 750 µL de solution larvaire à 2000 L3/mL.

Sous agitation constante à partir de 30mn jusqu'à 70mn, nous avons prélevé 200µl de la suspension du tube cristal après avoir homogénéisé. Ces 200 µl récupéré, on les mettait dans des tubes Eppendorf identifié, dans lequel on rajoutait 20µl de lugol dans chaque Eppendorf. Une fois que nous avons repérer à quel temps que nous avons un dégainement des larves a peu près de 100%, nous pouvons commencer à faire le test.

Le test de dégainement

Les 2000 L3 gainés ont été incubés avec chacun des TC aux concentrations de 2.5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml dans une solution tampon phosphatent(PBS) pendant 3h à température.

Après incubation, les larves sont lavées en centrifugeant trois fois dans du PBS. Ensuite, les larves ont été soumises au processus artificiel de dégainement par mise en contact avec une solution de NaCl 16,6% et d'eau de Javel défini lors de la mise au point. La cinétique de dégainement est mesurée sous observation microscopique à un grossissement de 40, en prélevant toutes les dix minutes, jusqu'à 70 minutes, 200 µl dans un tube Eppendorf de 1,5 ml dans lequel 20µl de Lugol a été distribué préalablement.

Pour chaque dose d'un même tanin condensé, cinq répétitions ont été exécutées. En plus des TC testés, un contrôle négatif (L3 dans PBS) a été exécuté en parallèle.

Analyses statistiques

Les données sont traitées selon deux analyses statistiques :

- une analyse de variance (ANOVA) par la procédure GLM à l'aide du logiciel Minitab Release 16 Software :).

La Pr value du test statistique permettant de comparer les moyennes (traitement et témoin) fixée à 95% pour conclure à l'équivalence des moyennes. Quand les Pr value est inférieur à 5% nous pouvons dire qu'il y a une différence significative entre les moyennes du traitement et du témoin.

- une analyse probit qui permet de déterminer la concentration inhibitrice 50 (CI50), à l'aide du logiciel SAS software 9.4 :

La CI50 est la dose requise pour inhiber à 50% le développement des parasites (dégainement et développement pour nous).

VI) Résultats

Cette étude avait comme objectif d'étudier in vitro l'activité anthelminthiques des TC des trois plantes (manioc, leucéna, pois angele), ainsi que la granulation de ces plantes sur différents stade du développement larvaire (stade 1 à 3) du parasite.

- Effets sur le développement larvaire

Les résultats des essais in vitro sur le développement larvaire sont présentés dans les figures A et B et les tableaux.

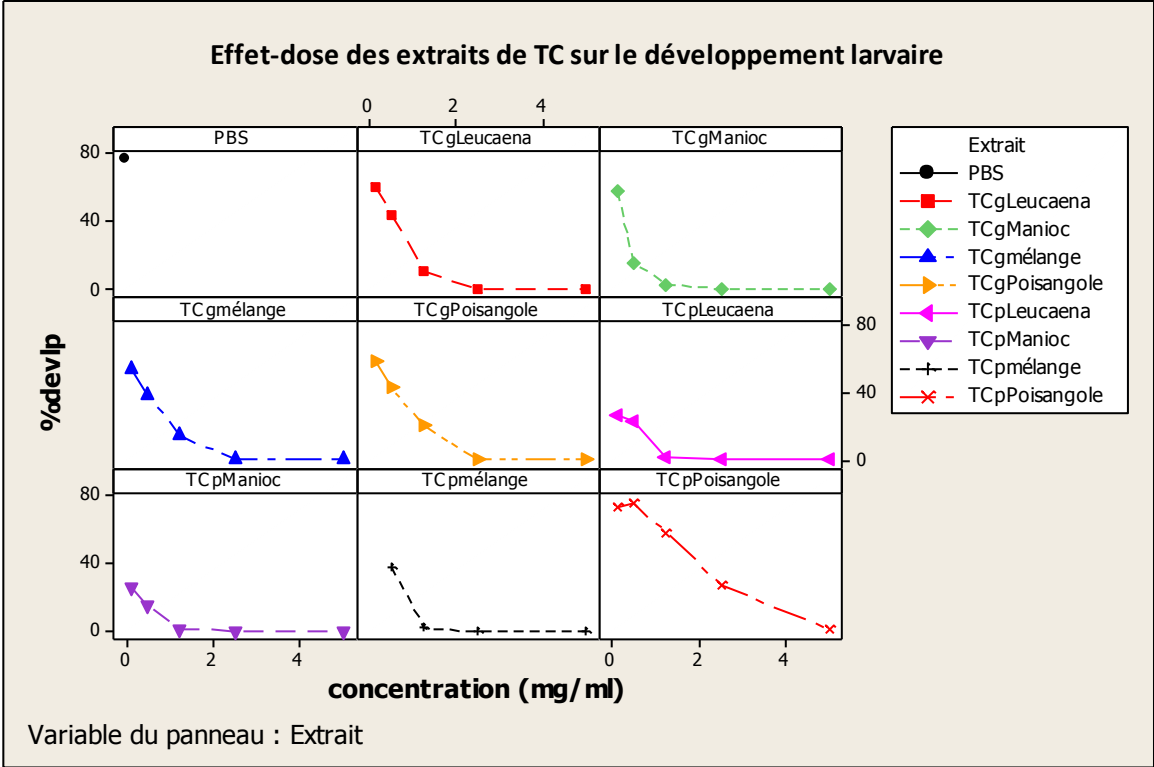


Figure A. Effet-dose des différents extraits de TC testés sur le développement larvaire d'*H.contortus*. g : granulé ; p : plante

a) *Fonctionnement du test LDA*

Le « PBS » témoin négatif a indiqué un pourcentage de développement de 77%. Ce qui indique que le test a bien fonctionné. En effet, un effet dose est globalement obtenu pour tous les extraits testés, dont les témoins positifs, pour lesquels ce phénomène effet dose est généralement observé. Ce dernier élément indique clairement un bon fonctionnement de l'essai.

De plus les témoins positifs c'est-à-dire les TC des plantes, sont significativement différents du témoin négatif PBS. Les résultats sont proches des valeurs habituelle obtenues au sein du laboratoire, mis à part pour les TC « pois d'angole » qui n'a pas bien répondu. Ces affirmations sont confirmées par la valeur des CI50 obtenues après l'analyse Probit (Voir tableau 1). Il ne sera donc pas tenu compte de cet échantillon pour la suite de la discussion.

Les témoins positifs montrent un pourcentage de développement moyen inférieur à 11%. Par conséquent, ils sont non significativement différents entre eux.

Traitement	Plante	CI50(mg/ml)	Limite inférieur	Limite supérieur
TC plante	Leucena	0,0837	0,06468	0,10382
TC plante	Manioc	0,0679	0,05054	0,08651
TC plante	Pois angole	1,95023	1,8399	2,05813
TC plante	Mélange	0,48203	0,43683	0,52383
TC granulé	Leucena	0,58936	0,52896	0,64576
TC granulé	Manioc	0,20558	0,1805	0,23091
TC granulé	Pois angole	0,65313	0,57237	0,72513
TC granulé	Mélange	0,35836	0,30627	0,4083

Tableau 1. Concentrations inhibitrices 50 (CI50) des extraits de tanins condensés des plantes et granulés, sur le développement larvaire du parasite *Haemonchus contortus*.

b) Effet du granulé et de la granulation

Un effet anthelminthiques du granulé est observé. En effet, les 3 TC granulé (leucéna, manioc, pois angoles) sont significativement différents du témoin PBS ($P < 0.001$), avec un développement larvaire compris entre 15 et 25%.

L'extrait de TC granulé le plus efficace est celui du manioc avec 8.7% de développement larvaire, et sa concentration inhibitrice 50 (CI50) est la plus faible. Par contre les extraits de TC granulé de leucéna et pois angoles ne sont pas significativement différents ($P > 0.05$), montrant des CI50 proches (voir tableau 1).

D'autre part, il est toujours observé une différence significative ($P < 0.05$) entre les TC granulés et les TC plante (Tableau 2) avec un pourcentage de développement des TC granulés supérieur à celui des TC plantes (CI50 supérieur). Ces résultats révèlent donc que la granulation diminue l'efficacité des TC (-7% pour le manioc, -13% pour le leucéna et -11% pour le mélange des 3).

c) Effet du mélange de granulés

Le mélange des extraits de TC des 3 plantes a rapporté un effet significativement différent de celui du témoin PBS ($P < 0.001$) avec un effet inhibiteur sur le développement larvaire (10% de développement larvaire). Cependant, l'effet du mélange des extraits des TC des 3 plantes n'est pas significativement différent de celui des extraits des TC individuels ($P > 0.95$). C'est l'extrait de TC plante de leucéna qui a l'effet le plus proche ($P = 1$) de ce mélange. De même, l'extrait de TC du mélange des 3 plantes a montré un effet significativement proche de celui de l'extrait de TC granulé leucéna.

	%developpement	Erreur Type	Pvalue vs PBS	Pvalue vs TCpLeucaena	Pvalue vs TCpManioc	Pvalue vs TCpPoisangole	Pvalue vs TCpmélange	Pvalue vs TCgLeucaena	Pvalue vs TCgManioc	Pvalue vs TCgPoisangole	Pvalue vs Tcgmélange
PBS	76,5401	0,6291		0	0	0	0	0	0	0	0
TcpLeucaena	10,1462	0,6594	0		0,854	0	1	0	0	0	0
TcpManioc	8,7101	0,6903	0	0		0	0,9196	0	0	0	0
TcpPoisangole	47,0656	0,6461	0	0	0		0	0	0	0	0
Tcpmélange	10,098	0,7729	0	1	0,9196	0		0	0	0	0
TcgLeucaena	22,9136	0,7591	0	0	0	0	0		0	0,9615	0,6617
TcgManioc	15,2976	0,6594	0	0	0	0	0	0		0	0
TcgPoisangole	24,1305	0,7028	0	0	0	0	0	0,9615	0		0,0285
Tcgmélange	21,1946	0,5527	0	0	0	0	0	0,6617	0	0,0285	

28

Tableau 2. Effet des extraits de tanins condensés des plantes et granulés sur le développement larvaire, moyennes et comparaison aux témoins

o Effet sur le dégainement des larves L3

Les résultats obtenus suite aux analyses statistiques Probit et ANOVA des données du test de dégainement des larves L3 sont présentés dans les figures (A1) et tableaux (3et 4) ci-après.

a) Fonctionnement du test

Le témoin négatif PBS montre une valeur moyenne de dégainement de 98% au bout de 70 minutes d'incubation. C'est donc au bout de cette durée que les échantillons seront comparés pour leurs efficacités.

Les témoins positifs (extraits TC de plante) sont tous significativement différents du témoin PBS ($P < 0.001$, tableau 4), avec un effet-dose semblable aux résultats obtenu en générale au laboratoire. De ce faite, le test s'est donc bien déroulé et les données vont pouvoir être exploitées.

b) Effet du granulé et de la granulation

Tous les 3 extraits de TC granulés sont significativement différents du témoin PBS ($P < 0.001$) avec des pourcentages de dégainement moyen compris entre 37 et 58%. Un effet dose est observé comme pour les témoins positifs. (Voir figure A1).

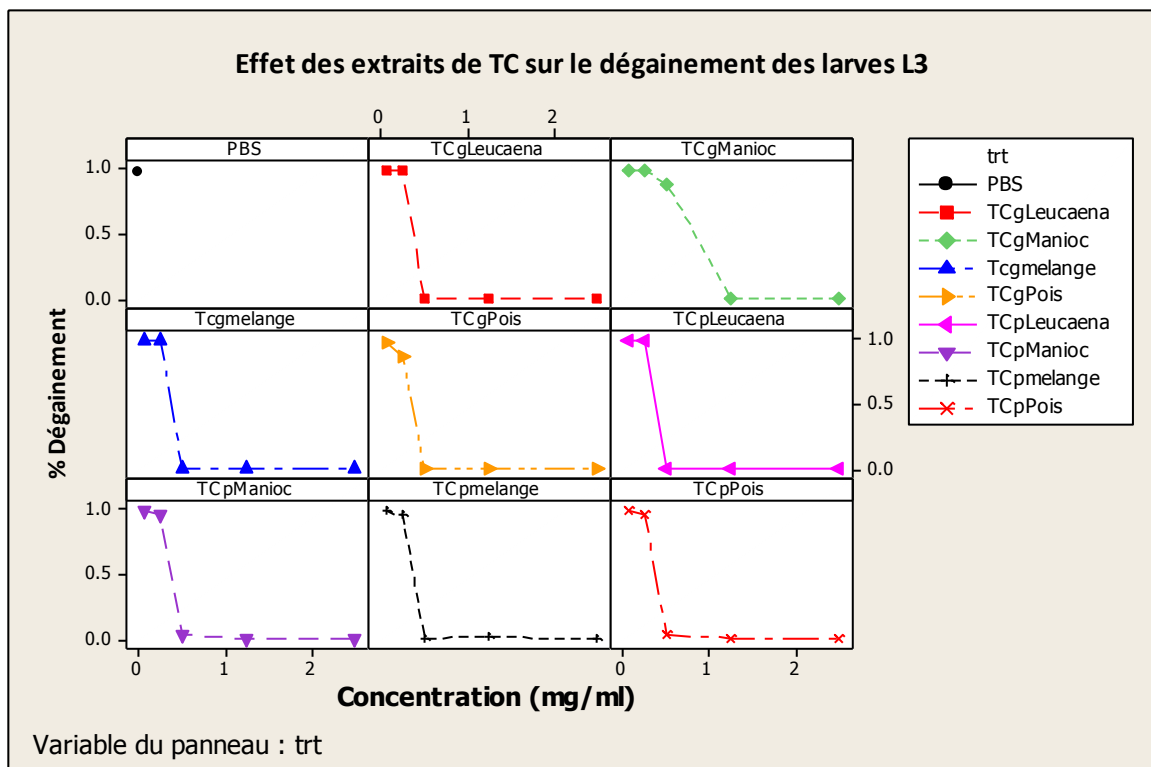


Figure A1. Effet-dose des différents extraits de TC testés sur le dégainement des larves L3 d'*H. contortus* (g : granulé ; p : plante).

L'extrait de TC granulé le plus efficace est celui du pois d'angole avec une concentration inhibitrice(CI50) de 0.32 mg/ml (Voir tableaux 3)

Traitements	Plantes	CI50 (mg/ml)	Limite inférieur	Limite supérieur
TC granulé	leucaena	0.35581	0.34681	0.36484
TC granulé	manioc	0.69934	0.67948	0.72051
TC granulé	mélange	0.35832	0.35002	0.36668
TC granulé	pois angole	0.32285	0.31577	0.33024
TC plante	leucaena	0.35683	0.34554	0.36809
TC plante	manioc	0.36213	0.35269	0.37193
TC plante	mélange	0.35266	0.34369	0.36172
TC plante	pois angole	0.36036	0.35173	0.36906

De plus, on observe que la granulation n'a pas d'incidence sur les effets des TC de leucena , manioc, pois d'angole et du mélange des plantes. En effet, comparativement aux témoins positifs : les pourcentages de dégainement des extraits de TC granulés leucena et du mélange de plantes ne sont pas significativement différents ($P>0.95$). En ce qui concerne le TC pois d'angole, même si on observe une valeur $P<0.001$, la valeur moyenne du pourcentage de dégainement est proche de celui du témoin positif correspondant (voir tableau4) De plus, les valeurs des CI50 sont proches. On peut donc conclure à des effets non significativement différents.

D'autre part, concernant l'extrait de TC granulé manioc, la granulation semble affecter l'efficacité du TC sur le dégainement ($P<0.001$ comparé au témoin positif), avec une réduction de 18% du dégainement de 48% de la CI50 (voir tableau 3 et 4).

c) Effet du mélange de granulés

Les résultats attestent un effet significatif du mélange des TC des 3 plantes sur le dégainement des larves ($P<0.001$ comparativement au témoin négatif PBS) avec un pourcentage de dégainement de 39%

De même, le mélange des extraits des TC granulés montre un effet significatif comparé au témoin PBS ($P<0.001$). Cet effet n'est pas significativement différent de celui des témoins positifs extraits de plantes individuels ($P=1$). De plus, l'effet est non significativement différent de celui de l'extrait de TC de granulé Leucaena ($P=1$), mais significativement différent de ceux de granulés de pois d'angole et manioc ($P=0$).

	%degainement	Efficacité	Erreur Type	Pvalue vs PBS	Pvalue vs TCpLeucaena	Pvalue vs TCpManioc	Pvalue vs TCpPoisangole	Pvalue vs TCpmélange	Pvalue vs TCgLeucaena	Pvalue vs TCgManioc	Pvalue vs TCgPoisangole	Pvalue vs Tcgmélange
PBS	0,9824	98,24	0,007021		0	0	0	0	0	0	0	0
TCpLeucaena	0,39931	39,931	0,003217	0		1	1	0,9377	1	0	0	0
TCpManioc	0,39767	39,767	0,003342	0	1		1	0,9932	1	0	0	1
TCpPoisangole	0,39972	39,972	0,003217	0	1	1		0,9092	0,9998	0	0	1
TCpmélange	0,39358	39,358	0,00314	0	0,9377	0,9932	0,9092		0,9952	0	0,0001	0,9673
TCgLeucaena	0,39734	39,734	0,00314	0	1	1	0,9998	0,9952		0	0	1
TCgManioc	0,57727	57,727	0,00314	0	0	0	0	0	0		0	0
TCgPoisangole	0,37078	37,078	0,003293	0	0	0	0	0,0001	0	0		0
TCgmélange	0,39864	39,864	0,00314	0	1	1	1	0,9673	1	0	0	

32

Tableau 4. Effet des extraits de tanins condensés des plantes et granulés sur le dégainement des larves L3, moyennes et comparaison aux témoins.

V) Discussion

Afin d'évaluer in vitro l'effet anthelminthique (AH) de granulés fabriqués à base de plantes contenant des tanins condensés (TC), les extraits de TC issus de ces granulés (individuels et mélange) ont été évalués sur le développement et sur le dégainement larvaires du parasite *H. contortus*.

Ces 2 types de tests ont été choisis car ils ciblent 2 étapes clés du développement intra (dégainement, stade infestant L3) et extra-hôte (développement larvaire, stades L1-L3).

Afin de mettre en évidence les effets de la granulation et du mélange des 3 granulés, les extraits de TC de granulés ont été comparés à ceux des plantes (témoins positifs) déjà évalués au laboratoire pour leur effet anthelminthique (Gillardot, 2014).

A. Effet de la granulation sur les propriétés anthelminthiques

Un effet anthelminthique du granulé est observé entre 75 et 85% d'efficacité sur le développement larvaire en moyenne et pour le dégainement entre 40 et 63% d'efficacité. Ces résultats confirment d'une part ceux obtenus précédemment sur ces plantes (Gillardot 2014), et montrent aussi que la granulation conserve les propriétés AH.

Même si l'effet AH est significatif, on observe cependant une baisse d'efficacité post granulation. De plus, la granulation affecte l'efficacité de manière variable en fonction de la nature des plantes et des stades de développement (-10% en moyenne pour le développement larvaire sur toutes les plantes et -18% sur le dégainement uniquement pour le manioc). Cette baisse d'efficacité peut être due à une modification de composition ou structurale des TC suite au traitement technologique de fabrication des granulés. En effet, il a été démontré que selon leur composition et leur structure, les TC pouvaient avoir des conséquences différentes sur l'efficacité anthelminthique. Par exemple un même TC peut avoir des effets différents sur des stades parasitaires distincts. Cela s'explique par leur variabilité de composition et de structure (Molan et al 2003 ; Brunet and Hoste, 2006). D'autre part, certains paramètres comme la température et l'humidité peuvent altérer les tanins (Cano et al., 1994 ; Wolfe et al., 2008). En effet, les tanins sont thermolabiles, et un effet dépressif de la température sur la teneur en TC est observé dès 40°C (Palmer et al., 2000). Les granulés ont été préparés à base de plantes séchées sous serre (séchage doux) mais le procédé de granulation implique un traitement thermique au moment du broyage et de la granulation. Il serait donc être intéressant d'étudier les facteurs influençant (température, humidité) la composition du granulé en TC afin de modifier le procédé de fabrication et ainsi améliorer la qualité du produit granulé.

B. Effet du mélange de granulés sur les propriétés anthelminthiques

Pour les 2 stades parasitaires évalués, le fait de mélanger les 3 extraits de TC n'a pas eu d'incidence sur l'effet AH (effet conservé et non significativement différent des extraits individuels). Des études ont montré qu'il pouvait y avoir des effets synergétiques entre TC et flavonoïdes, avec une différence d'impact en fonction de la structure des TC (Klongsiriwet et al., 2015). Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire laissaient penser que les TC des 3

plantes testées pouvaient avoir des structures différentes (Gillardot 2014) et que ces différences structurales expliquaient les différences d'efficacités.

En mélangeant les TC des 3 plantes, on aurait pu s'attendre à une augmentation de l'effet AH par addition ou synergie. De plus, on note que dans le cas du développement larvaire, l'effet du mélange de TC est comparable à celui du TC de leucaena, alors que le TC le plus efficace est celui du manioc.

Une hypothèse serait que le TC de manioc serait en quantité insuffisante dans le mélange pour augmenter l'effet. Une autre hypothèse est celle de la cible visée par les molécules : si elle est la même, alors l'effet additif ou synergie ne sera pas observé. Il serait intéressant d'identifier les mécanismes d'action afin de mieux comprendre la nature synergétique ou additive de l'effet obtenu pour le test LDA.

D'autre part, dans nos essais, les TC de manioc, Leucaena et pois d'angle ont des effets individuels équivalents, avec des effets sur le développement larvaire supérieurs à ceux observés sur le dégagement à mêmes doses testées. (CI50 dégagement > CI50 développement). De plus, le mélange d'extraits donne un effet supérieur sur le dégagement (CI50 développement > CI50 dégagement).

Afin de cibler le stade de dégagement, il serait approprié d'utiliser le mélange d'extraits au lieu des plantes individuelles.

Conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer in vitro l'effet anthelminthique de granulés pour animaux fabriqués à base de plantes contenant des tanins condensés (TC). Pour cela les extraits de TC ont été évalués sur le développement et sur le dégainement larvaire du parasite *H. contortus*.

L'étude a mis en évidence que même s'il engendre une baisse d'efficacité, le procédé de granulation mis au point conserve les propriétés anthelminthiques des TC. D'autre part, le mélange des plantes conserve aussi l'effet anthelminthique moyen, mais ne l'augmente pas comparativement aux plantes testées individuellement.

Une étude plus poussée sur les mécanismes d'action et la composition du mélange permettraient d'expliquer et d'améliorer le mode d'action du mélange de TC. De plus, il serait nécessaire de valider l'effet en conditions in vivo afin de confirmer la nécessité d'étudier ou non une modification de la technologie de fabrication, en jouant sur la température notamment, pour diminuer l'impact sur les propriétés anthelminthiques des TC.

Résumé

L'apparition de résistances aux molécules de synthèse rend la lutte contre le parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants d'élevage de plus en plus difficile.

Dans le cadre de la lutte intégrée contre le parasitisme gastro-intestinal, le laboratoire de l'Unité de Recherche Zootechnique de l'INRA (URZ) travaille sur l'élaboration de granulés à base de plantes contenant des tanins condensés, molécules à effet anthelminthique.

L'étude réalisée vise à évaluer in vitro sur le parasite *Haemonchus contortus*, l'effet anthelminthique de granulés fabriqués à partir des 3 plantes tropicales préalablement séchées sous serre: *Manihot esculenta*, *Leucaena leucocephala* et *Cajanus cajan*. Pour cela, les extraits de TC issus de ces granulés (individuels et mélange) ont été évalués sur le développement et sur le dégainement larvaires du parasite *H.contortus*, étapes clés du développement intra et extra-hôte.

L'étude a mis en évidence que même s'il engendre une baisse d'efficacité, le procédé de granulation mis au point conserve les propriétés anthelminthiques des TC. D'autre part, le mélange des plantes conserve aussi l'effet anthelminthique moyen, mais ne l'augmente pas comparativement aux plantes testées individuellement.

Une étude in vitro et in vivo plus poussée sur les mécanismes d'action et la composition du mélange permettraient d'expliquer et d'améliorer le mode d'action du mélange de TC.

Summary in English

The fight against the gastrointestinal parasitism of small ruminants is more and more difficult because of the emergence of synthetic resistant molecules.

Despite all that, the laboratory of the Research Unit of INRA Zootechnique (URZ) is working on the development of herbal granules containing condensed tannins molecules with an anthelmintic effect.

The study is realized in order to assess *in vitro* the anthelmintic effect of the parasite *Haemonchus contortus* on pellets made from the 3 previously dried tropical plants in greenhouses: *Manihot esculenta*, *L. leucocephala* and *Cajanus Cajan*. That's why, the TC extracts from these granules (individual and mixture) were evaluated on the development and on the drawing of the larval parasite *H. contortus*, key milestones of the development within and outside the host.

The study revealed that while it generates a decrease of efficiency, the granulation process keeps anthelmintic properties of TC. On the other hand, the mixture of the plants also keeps the average anthelmintic effect but it does not increase comparing to plants individually tested.

A further study *in vitro* and *in vivo* study on the mechanisms of action and the composition of the mixture could explain and improve the mechanism of action of TC mixture.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aaron Nix, Cate A Paull, and Michelle Colgrave Published online 2015 Mar 13 The flavonoid profile of pigeonpea, *Cajanus cajan*: a review

Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545-554.

Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008a. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International journal for parasitology* 38, 783-790.

Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7481-7487.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris Cachan : Éd. Tec & doc Éd. médicales internationales, Paris Cachan.

Cano, R., Carulla, J., Lascano, C.E., 1994. Methods for preserving tropical forage legumes and their effects on the concentration and metabolism of tannins. [Spanish] 7600. *Pasturas Tropicales* 16, 2-7.

Carine MARIE MAGDELAINE et Harry ARCHIMEDE : plantes anthelminthiques pour les animaux d'élevage février 2015.

Carine MARIE-MAGDELAINE thèse « étude des ressources végétales tropicales pour un usage anthelminthiques en élevage ruminants. Juin 2009.

Cohen S.D, Tarara J ;M, Kennedy J.A(2008) Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Analytica chimica acta*, 621,57-67.

Dahomé Liza : Rapport de stage « évaluation de l'effet du site de récolte et du séchage sur la composition en TC de 4 ressources végétales. 30 juin 2014.

E. O. Ajaiyeoba, O. O. Ogbale, O. O. Abiodun, J. S. Ashidi, P. J. Houghton, and C. W. Wright : Cajachalcone: An Antimalarial Compound from *Cajanus cajan* Leaf Extract Journal of Parasitology Research Volume 2013, Article ID 703781, 5 pages

FAO ((organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

Fernades de Oliveira, A., Nieddu,G(2013) Deficit Irrigation Strategies in *Vitis vinifera* L. cv . Cannanau under Mediterranean Climate. Part II-Cluster Microclimate and Anthocyanin Accumulation Patterns.S.Afr.J.Enol.Vitis, 34,184-185

Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin- rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends in parasitology 22, 253-261.

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. Veterinary Parasitology 180, 144-154.

Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Veterinary Record 130, 442-446.

Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., Hoste, H., 2015, Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 5, 127-134.

Maria Lenira Leite-Browning, *Haemonchus contortus* (Barber Pole Worm) Infestation in Goats *Extension Animal Scientist*, Alabama A&M University : Décembre 2006

Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. Animal Feed Science and Technology 106, 3-19.

Mohammad Mansoor, Cheelapogu Venkateswarlu....2015 : KC Institut Reddy des sciences pharmaceutiques

Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. International journal for parasitology 33, 1691-1698.

Monoj K. Ghosh et Samiran Bandyopadhyay, 2007. mimosine Toxicité-A Problème de *Leucaena* alimentation en Ruminants Asian Journal of Animal et avances vétérinaires, 2: 63-73.

Pal, D., Mishra, P., Sachan, N., Ghosh, A.K., 2011. Biological activities and medicinal properties of *Cajanus cajan* (L) Millsp. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* 2, 207- 214.

Palmer, B., Jones, R.J., Wina, E., Tangendjaja, B., (2000), The effect of sample drying conditions on estimates of condensed tannin and fibre content, dry matter digestibility, nitrogen digestibility and PEG binding of *Calliandra calothyrsus*. *Animal Feed Science and Technology*, **87**, 29 – 40.

Paolini, V., 2004. Effet des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux chez la chèvre. Université de Perpignan Perpignan.

Paolini, V., Bergeaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology* 113, 253-261.

Pomroy, W.E., Adlington, B.A., 2006. Efficacy of short-term feeding of sulla (*Hedysarum coronarium*) to young goats against a mixed burden of gastrointestinal nematodes. *Veterinary parasitology* 136, 363-366.

QUIJADA Jessica thèse »Relation structure/activité des tanins bioactifs contre les nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus*) parasites des petits ruminants, décembre 2015

Sendow, J., 2003. *Haemonchus contortus*, Animal Diversity Web. University of Michigan Museum of zoology.

Wolfe, R.M., Terrill, T.H., Muir, J.P., 2008, Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1060-1067.

9999