



HAL
open science

Contribution à l'étude de l'effet anthelminthique de ressources tropicales en santé animale

Cindy Gustave

► **To cite this version:**

Cindy Gustave. Contribution à l'étude de l'effet anthelminthique de ressources tropicales en santé animale. [Stage] Autres régions du monde. Université des Antilles - Site de Guadeloupe (UA), FRA. 2016, 26 p. hal-02796460

HAL Id: hal-02796460

<https://hal.inrae.fr/hal-02796460>

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.

UNIVERSITE DES ANTILLES ET DE LA GUYANE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES ET NATURELLES



Faculté des Sciences Exactes et Naturelles



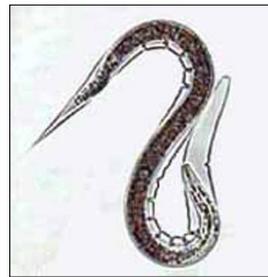
Domaine de Duclos Petit-Bourg

LICENCE 3 BIOLOGIE-BIOCHIMIE
SCIENCE, TECHNOLOGIES ET SANTE
Parcours : Biologie Sciences de la Santé

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'EFFET ANTHELMINTHIQUE DE RESSOURCES TROPICALES EN SANTE ANIMALE

Présenté par

GUSTAVE Cindy



Stage effectué au sein de l'Unité de Recherche Zootechnique de l'INRA

Du 11 Janvier au 06 Février 2016

Responsable de stage INRA : Dr Carine MARIE-MAGDELEINE CHEVRY

Responsable de stage UAG : Marie-Noëlle SYLVESTRE

UNITE DE RECHERCHE ZOOTECHNIQUE DE L'INRA

Remerciements

Je remercie monsieur OZIER-LAFONTAINE Harry, Président de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), ainsi que Nathalie MANDONNET, Directrice de de l'Unité de Recherche Zootechnique (URZ).

Je tiens fermement à remercier Mme Carine MARIE-MAGDELEINE d'avoir bien voulu m'accueillir dans le laboratoire URZ, afin que je puisse effectuer mon stage de 3^{ème} année de licence au sein de son équipe. Je la remercie de son accueil chaleureux et de sa gentillesse. Je te remercie de m'avoir permis d'acquérir de l'expérience professionnelle, car j'ai pu avoir une vision du travail en situation réelle. Et surtout merci de ton savoir-faire et au dialogue humain que tu entretiens avec les stagiaires.

Je remercie Tatiana SILOU-ETIENNE de m'avoir encadré durant ces semaines de stage, de sa patience, d'avoir su m'écouter et ainsi que de m'avoir enseigné de nouvelles techniques.

Merci à Steve et à tous les stagiaires pour tous les bons moments passés ensemble, d'avoir eu une présence chaleureuse, permettant de mettre une bonne ambiance au sein du laboratoire.

Je remercie également toute l'Unité de Recherche Zootechnique, Suzitte CALIF, Lucien FILIBERT, Dalila FEUILLET, Yoann FELICITE et tous les autres de l'équipe de m'avoir offert un bon accueil, guidé et conseillé durant ce stage.

Merci à mes amis et ma famille pour leur soutien. Je remercie tout particulièrement mon papa pour m'aider et me donner les moyens pour avancer dans la vie, ma maman pour son soutien, ainsi que Diego pour son aide, ses encouragements et ses conseils.

Table des matières

Liste des abréviations.....	5
Présentation de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)	6
Résumé	7
I. INTRODUCTION.....	8
1. Contexte général	8
2. Synthèse bibliographique.....	9
➤ Le parasite <i>Haemonchus contortus</i>	9
➤ La Phytothérapie.....	10
➤ Les Tanins condensés	11
➤ Choix des plantes à tanins pour les tests <i>in vitro</i>	12
II. Matériels et méthodes	14
1. Matériels.....	14
➤ Matériel biologique : Larves L3	14
➤ Matériel Végétal : TANINS CONDENSES.....	14
2. Méthodes	15
➤ But et principe du test LEIA.....	15
➤ Mode opératoire.....	15
○ Mise au point du test de dégainement	16
○ Mise en contact des larves avec les tanins.....	17
○ Test de dégainement	18
▪ Essai préliminaire	18
▪ Essais sur les 5 plantes sélectionnées	19
➤ Analyses statistiques.....	19
III. Résultats et discussion.....	20

➤ Essai préliminaire	20
➤ Essais sur les 5 plantes sélectionnées	21
○ Efficacité et effet doses	21
○ Détermination de la CI50	22
IV. Conclusion - Perspectives	23
Apport personnel du stage.....	24
Références bibliographiques	25

Liste des abréviations

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

URZ : Unité de Recherche Zootechnique

H.contortus : *Haemonchus contortus*

SIG : Strongle Gastro-Intestinal

TC : Tanin condensé

LEIA : Larval Exsheathment Inhibition Assay (Test de dégagement larvaire)

PBS : Phosphate Buffer Sample = Tampon Phosphate

SL_{2000L3/mL} : Solution Larvaire à 2000 L3/mL

Na : Sodium

Cl : Chlore

NaCl : Chlorure de sodium

Présentation de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

L'Institut National de la Recherche Agronomique ou INRA est un organisme français de recherche en agronomie fondé en 1946, présidé depuis 2012 par François Houllier. Il est le premier institut de recherche agronomique en Europe et deuxième en sciences agricoles dans le monde. Ses recherches concernent les questions liées à l'agriculture, à l'alimentation et à la sécurité des aliments, à l'environnement et à la gestion des territoires, avec un accent tout particulier en faveur du développement durable.

INRA Antilles-Guyane

Le centre Antilles-Guyane fait partie des dix-neuf centres de recherche et est divisé en trois unités de recherche :

- L'Unité de Recherche Agrosystèmes tropicaux (URASTRO)
- L'Unité Mixte de Recherche Ecologiques des Forêts de Guyane (ECOFOG)
- L'Unité de Recherche Zootechnique (URZ)

Unité de Recherche Zootechnique

Crée en 1965, l'URZ vise à l'amélioration des productions animales dans la zone tropicale humide. Ses compétences concernent principalement la Guadeloupe et la Martinique, mais s'étendent également à la région Caraïbe et au milieu tropical humide dans son ensemble. Les espèces animales concernées sont les bovins, les caprins, les ovins et les porcins. Le projet de l'URZ vise à promouvoir des Systèmes d'élevage efficaces dans un milieu à fortes contraintes dans une perspective agroécologique. Dans cet objectif, l'URZ est organisé en 3 groupes de travail:

- Adaptation et résilience des animaux pour les systèmes d'élevage tropicaux durables
- Optimisation de fonctions en vue de l'efficacité des systèmes d'élevage tropicaux
- Valorisation des savoirs, expertises et innovations

Résumé

De nombreux animaux au pâturage tels que les ovins, bovins et caprins sont atteints de certaines maladies. Le parasitisme est un très grand problème chez les ruminants dans la zone Caraïbe. Les **parasitoses digestives**, pathologie majeure des petits ruminants, est causé par les **nématodes parasites gastro-intestinaux**, également appelés **strongles digestifs** ou **strongles gastro-intestinaux (SGI)**, notamment par l'espèce *Haemonchus cortortus*. Pour pallier à ce problème, des traitements sont élaborés, ce sont les **anthelminthiques**. Cependant, les éleveurs utilisent de manière excessive les anthelminthiques, ils dépassent la dose nécessaire pour traiter l'animal, ce qui entraîne une résistance des nématodes aux **anthelminthiques de synthèse**. Pour pallier à ce problème, d'autres molécules sont recherchées afin de traiter ces maladies. De nombreuses études ont montrés que grâce à un composé naturel des plantes, les **tanins condensés** qui sont un **métabolite secondaire** des plantes, le développement larvaire est stoppé, ainsi les parasites ne peuvent plus évoluer et ne sont donc plus nocifs pour l'animal.

L'objectif de ce stage est donc de tester *in vitro* diverses plantes sur le dégagement des larves de type L3 (larve infestante), afin de déterminer lesquels sont les plus efficaces afin de stopper le développement de la larve. Les tanins de ces plantes sont testés à différentes concentrations, dans le but de déterminer qu'elle tanin condensé est le plus efficace et à partir de quelle concentration de tanin le produit sera efficace, c'est-à-dire à la concentration la plus basse efficace, afin de ne pas entraîner une résistance des larves aux anthelminthiques.

Nos résultats ont montré que les tanins condensés du Cajou sont ceux qui agissent le mieux sur le dégagement des larves, ils sont donc d'une grande efficacité.

I. INTRODUCTION

1. Contexte général

Les **parasitoses digestives** dues aux **nématodes parasites gastro-intestinaux** également appelés **strongles gastro-intestinaux (SGI)**, sont une pathologie majeure des petits ruminants de la zone Caraïbe élevés à l'herbe., é Elles peuvent entraîner des pertes de production importantes (Paolini et al. 2002). Dans les régions tropicales, les conditions environnementales favorisent le développement des strongles hématophages hautement pathogènes comme *Haemonchus contortus*. Les parasitoses digestives peuvent être traitées par des **anthelminthiques de synthèse**, qui sont des médicaments antiparasitaires. Cependant, l'utilisation déraisonnée de ces produits sur les 50 dernières années a entraîné l'apparition de résistances des parasites (Kaplan and Vidyashankar, 2012; Torres-Acosta et al., 2012). Par exemple en Guadeloupe, une enquête a montré que tous les élevages de chèvres sont résistants aux Benzidazoles et la plupart d'entre eux présentent des résistances à 2 ou 3 familles d'anthelminthiques de synthèse (Mahieu et al., 2014). Ainsi, pour lutter contre les parasites, mais également éviter l'apparition du phénomène de résistance qui pose problème de nos jours, il devient nécessaire de « traiter mieux – traiter moins ». Cela passe par la mise en place de bonnes pratiques, c'est-à-dire de renforcer la résistance de l'hôte (le mouton), gérer les pâturages afin de diminuer la contamination du milieu extérieur et aussi d'utiliser les antiparasitaires à bon escient (Issautier, 2009). D'autres moyens de traitement à partir de molécules issues de plantes (les métabolites secondaires) sont encore en cours de recherche. De nombreuses études (Paolini et al. 2002 ; Marie-Magdeleine et al. 2010 ; Schneider et al. 2015). ont démontré une réduction du parasitisme chez le mouton, grâce à la consommation de plantes riches en tanins condensés (TC) De plus, les études expérimentales *in vivo* utilisant des extraits de quebracho (une source très riche en tanins condensés) ont confirmé les premiers résultats obtenus avec des plantes à TC (Athanasiadou et al., 2001). Par ailleurs, plusieurs plantes à TC possèdent une activité anthelminthiques, alors que d'autres n'en n'ont pas (Pomroy and Adlington, 2006).

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer *in vitro* les effets inhibiteurs de TC issus de sept plantes différentes sur une étape du développement larvaire d'*H. contortus* : le dégainement de la larve L3.

2. Synthèse bibliographique

Le parasite *Haemonchus contortus*

Il existe plusieurs types de larves parasites des ovins, parmi lesquelles peuvent être citées les **Cestodes (ténias)**, les **Trématodes (douve)** et les **Nématodes (vers ronds)**. *Haemonchus contortus* est un nématode hématophage de la famille des *Trichostrongylidae*. C'est un parasite très commun et il est l'un des nématodes les plus pathogènes des petits ruminants. Les animaux sensibles tels que les jeunes ruminants de première année, les femelles en gestation ou allaitantes et les animaux malades ou affaiblis, ont peu d'immunité et ont donc une faible résistance face aux parasites.

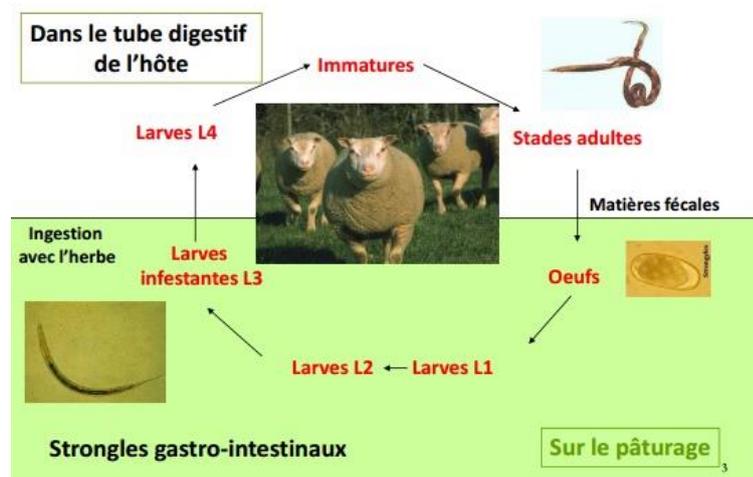


Figure 1. Cycle parasitaire des strongles

François, D., Jacquet, P., Moreno, C., Astruc, JM., 2014.
Sélectionner la Résistance au Parasitisme gastro-intestinal.

Les larves femelles (stade adulte) sont localisées dans l'estomac (caillette) de l'animal (hôte) où elles pondent quotidiennement 5 000 à 10 000 œufs. Les œufs sont éliminés par les fèces dans le milieu extérieur. A température optimale (24 à 29°C), les œufs éclosent après quatre à six jours pour donner des larves L1. Environ 24 à 48 heures après éclosion, elles se développent en larves L2. Si les conditions de température et d'humidité sont favorables, les larves infestantes L3 (avec lesquels nous avons travaillé pour cette étude) se forment dans les matières fécales, après deux à quatre jours, à partir des œufs rejetés par l'animal parasité. Afin d'être ingéré par les ruminants, elles doivent se déplacer ou être transportées jusqu'à l'herbage le plus proche et migrer au sommet des brins d'herbe. Les larves acquièrent une gaine protectrice qui leur permettent de survivre

dans le milieu, mais qui les protègent également lors de leur passage dans le tractus digestif. Une fois avalées, les larves L3 transitent dans le tube digestif jusqu'à la caillette. Elles perdent leur gaine protectrice (figure 2.3) et pénètrent dans la muqueuse de la paroi de la caillette dans les six heures qui suivent leur ingestion; elles demeurent dans la paroi digestive pendant environ deux à trois semaines. La température de l'environnement digestif augmente, causée par l'accumulation des larves dans l'estomac, entraînant après 48 heures le développement des larves L3 en larves L4 hématophages. Les quatre à six jours qui suivent, les larves L4 évoluent en larves immatures L5, puis passent au stade adulte et la reproduction devient donc possible.



Figure 2.1. Larve gainée



Figure 2.2. Larves dégainées



Figure 2.3. Gaine

La Phytothérapie

Les plantes ou leurs extraits, sont utilisées contre tous types de pathologie. Les composés produits par les plantes se divisent en deux catégories : **les métabolites primaires et les métabolites secondaires**.

Les **métabolites primaires** sont des molécules qui existent dans toutes les cellules végétales et sont nécessaire à la vie de la plante. On retrouve parmi eux, les **sucres simples, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques**.

Les **métabolites secondaires** sont important à la survie et à la propagation des plantes qui les reproduisent. Parmi eux, on compte : **les tanins, les saponosides, les alcaloïdes, polyphénols, terpènes, stéroïdes, acides aminés non protéiques, glucosides cyanogènes et autre hétérosides**. Ils ont une répartition limitée, dans la plante elle-même comme parmi les différentes espèces végétales. Ces composés ne sont pas au sens strict indispensables aux fonctions principales de la plante. Les métabolites secondaires ont un **rôle nutritionnel**, ainsi qu'un **rôle de défense** de la plante.

Les **tanins** sont des substances amères, mais plus précisément des **substances naturelles phénoliques**. Ce sont des **métabolites secondaires** des plantes supérieures et

se trouvent dans presque toutes les parties des végétaux tels que les écorces, les fruits, les gousses, les feuilles, les racines ou les graines de certains végétaux. Ils jouent un rôle d'arme chimique défensive contre certains parasites. On distingue deux groupes selon leur structure et la voie de leur synthèse : les **tanins hydrolysables (Gallotanins, Ellagitanins, tanins complexes)** et les **tanins condensés (TC)**.

Les Tanins condensés

Les **TC**, également appelés **proanthocyanidols** sont des polymères de **flavan-3-ol** à noyau flavone. Ils ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables (Paolini et al. 2002). La consommation de TC à de trop fortes concentrations (<7% de matière sèche (MS)) est nocive pour les herbivores (réduction de la prise alimentaire, interférence avec la morphologie et l'activité protéolytique des microbes dans le rumen), tandis qu'à de plus faibles concentrations ou modérées (>6% de MS), elle a plutôt des effets positifs sur les ruminants (réduction de la prise alimentaire, interférence avec la morphologie et l'activité protéolytique des microbes dans le rumen).

Les TC agissent en **inhibiteur** sur le cycle larvaire, ils empêchent le dégainement de la larve. Ainsi, les larves deviennent inoffensives pour les ruminants.

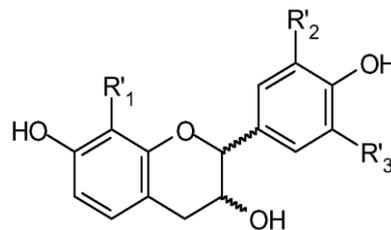


Figure 3. Structure des tanins

<http://www.google.com/patents/WO2009004242A2?cl=fr>

Choix des plantes à tanins pour les tests *in vitro*:

Pour les tests de mise en contact des larves avec les tanins, nous avons sélectionné des plantes appartenant à des familles botaniques diverses et contenant des tanins condensés :

➤ **Goyavier** (*Psidium guajava*)

Le **goyavier** ou *Psidium guajava* est une espèce d'arbre fruitier de la famille des *Myrtaceae*, originaire des régions tropicales d'Amérique. Son fruit est la goyave.

Astringent, stimulant, antioxydant, anti-inflammatoire et antidiarrhéique.



<http://www.phytomania.com/goyavier.htm>

Figure 4. Goyavier

➤ **Raisinier** (*Coccoloba uvifera*)

Le **raisinier** ou *Coccoloba uvifera* est une espèce d'arbre fruitier de la famille des *Polygonaceae*. Son fruit est le raisin.

Anti-diarrhéique, et astringent.



<http://www.complements-alimentaires.co/raisinier/>

Figure 5. Raisinier

➤ **Anacardier** (*Anacardium occidentale*)

L'**anacardier** ou *Anacardium occidentale* est un arbre fruitier de la famille des *anacardiaceae*. Son fruit est la noix de cajou.

Hypocholestérolémiant, laxatif, antibactérien, fongicide, etc...



<http://mireille.free.fr/flore-reunion/fruits-run/images/anacardier-fr.jpg>

Figure 6. Anacardier

➤ **Icaquier** (*Chrysobalanus*)

L'**icaquier** ou *Chrysobalanus* est un arbuste des régions chaudes de l'Amérique, proche des pruniers. Il fait partie de la famille des *rosaceae*. Son fruit est l'icaque.

Astringent, anti-diarrhéique et anti-dysentérique.



<http://www.terrelocale.net/L-ICAQUE.html>

Figure 7. Icaquier

➤ **Manguier (*Mangifera indica*)**

Le **manguier** ou ***Mangifera indica*** est un arbre fruitier de la famille des *Anacardiaceae*, originaire d'Asie méridionale. Son fruit est la mangue.

Diurétique, laxatif, stimulant, sudorifique, vomitif, vermifuge, astringent et anti-inflammatoire.



<http://www.aujardin.info/fiches/planter->

Figure 8. Manguier

➤ **Leucaena (*Leucaena leucocephala*)**

Le **leucaena** ou ***Leucaena leucocephala***, encore appelé **faux mimosa** est un arbuste ou arbre originaire d'Amérique centrale, de la famille des *mimosaceae*. Certaines espèces ont des fruits et graines comestibles. La plante contient la *mimosine* qui est une substance toxique. Il détient des propriétés médicinales.



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/49/Leucaena_leucocephala.jpg

Figure 9. Leucaena

➤ **Grenadier (*Punica granatum*)**

Le **grenadier** ou ***Punica granatum*** est un arbre fruitier de la famille des *lythraceae*. Il est originaire d'Asie occidentale. Son fruit est la grenade.

Dépuratif, reminéralisant et alcalinisant.



<http://www.visoflora.com/images/original/fruit-de-grenadier-visoflora-41469.jpg>

Figure 10. Grenadier

II. Matériels et méthodes

1. Matériels

Matériel Biologique : Larves L3

Afin de pouvoir effectuer les essais *in vitro*, le matériel biologique nécessaire a été récupéré sur un ovin préalablement infesté expérimentalement par des souches du parasite *H. contortus*. Nous avons travaillé sur des souches sensibles du parasite, c'est-à-dire qui n'ont pas de résistances face aux anthelminthiques chimiques ou de synthèse, afin de pouvoir observer un effet thérapeutique dans le cas d'un traitement à dose habituelle par voie générale. Les fèces de l'animal ont été recueillies post-infestation au mois de novembre, dont une partie a été mise en culture afin de produire **les larves de stade L3** (coproculture) et l'autre a été traitée afin d'en extraire les œufs.

Afin de confirmer et de compléter les résultats de la première expérimentation, d'autres larves de souche sensible ont été récupérées au mois de janvier à partir d'un autre ovin.

Matériel Végétal : TANINS CONDENSES

Les **7 plantes** qui ont été choisi pour effectuer les tests *in vitro* sont le **cajou**, l'**icaque**, le **leucaena**, le **manguier**, le **goyavier**, la **grenade** et le **raisin** (figure 11). Les TC purs utilisés pour cette étude ont été extrait préalablement de ces plantes par le laboratoire de l'URZ. Pour la grenade, les TC ont été extrait de la peau du fruit, tandis que pour les autres plantes, ils ont été extraits à partir des feuilles.



Manguier Goyavier Icaque Raisin Grenade Cajou

Figure 11. Tanins condensés des plantes pour les essais *in vitro*

Le feuillage des plantes et la peau de la grenade ont été lyophilisées. La poudre de plante obtenue a été ensuite dépigmentée, puis extraite à l'acétone 70% dans l'acide ascorbique. L'extrait brut est finalement purifié sur un gel de Sephadex LH20, afin d'obtenir les TC.

2. Méthodes

Nous avons réalisé les essais en deux étapes, une étape préliminaire où l'on a ciblé parmi les 7 plantes, celles ayant un plus grand taux d'efficacité et une deuxième étape où l'on a cherché la concentration minimale en tanin efficace des 5 plantes sélectionnées (cajou, goyavier, raisinier, icaque et manguier).

But et principe du test LEIA

Le test LEIA ou **Larval Exsheathment Inhibition Assay**, en français « **Test d'inhibition du dégainement larvaire** » vise à tester l'efficacité de différentes molécules, dont les TC, ou extraits de plantes sur le dégainement des larves infestantes (L3).

Mode opératoire

Pour que les tests *in vitro* puissent être réalisés, il faut préparer une solution larvaire dont nous avons décidé de la concentration à 2000 L3/mL (**SL_{2000L3/mL}**) à partir des souches sensibles récupérées dans les fèces de l'animal.

Lorsque l'on observe les larves il vaut mieux trouver le moins de larves mortes possible, si tel n'est pas le cas, on utilise la **méthode de Baermann** (figure 12) permettant de récupérer le maximum de larves vivantes, est mise en œuvre.

L'appareil de Baermann est composé d'un entonnoir, prolongé par un tube clampé, fixé à un support, dans lequel on ajoute de l'eau. Au-dessus de l'entonnoir est disposée une passoire contenant une feuille de gaze ou un papier absorbant sur lequel on verse la solution de larve. Par contact avec l'eau, les larves vivantes vont migrer au fond du tube pour former un culot qui sera récupéré à l'aide d'une pipette graduée, tandis que les mortes seront retenues par le papier.



Figure 12. Méthode de Baermann

Premièrement, le volume de solution larvaire récupéré (culot) est mesuré et deuxièmement, il faut compter le nombre de larve contenu dans la totalité du volume. Pour ce faire, on dépose sur une plaque 10 gouttes de 10µL dans lesquelles on compte le

nombre de larves. Ensuite, le nombre de larves dans chaque goutte est sommé pour 100µL, puis on fait un calcul dans 1mL et enfin le total du volume.

- Exemple : On a un volume de 55mL contenant 990 L3/ml . On calcule :

$10 \text{ (gouttes)} * 10\mu\text{L} = 100\mu\text{L}$ donc, 99 L3 vivantes/100µL → 990 L3 vivantes/1000µL (1mL) $990 * 55 = 54\,450 \text{ L3}$ → 54 450 L3 dans 55 mL
--

Ainsi, lorsque le comptage est fini, on calcule la quantité de tampon phosphate salin (PBS) dans laquelle le culot de larves après centrifugation sera mis en suspension afin d'obtenir la $SL_{2000L3/mL}$.

- Exemple $54\,450/2000 = 27.22 \text{ ml de PBS}$

○ Mise au point du test de dégainement

Cette étape est primordiale pour la réussite de l'expérience. Elle a pour but de définir la concentration de solution hypochlorite permettant le dégainement de la totalité des larves (100%) à 50 (T50), 60 (T60) ou 70 minutes (T70).. Cette mise au point doit être impérativement faite avant tout commencement du test de dégainement, pour vérification.

La $SL_{2000L3/mL}$ préparée précédemment est soumise au processus artificiel de dégainement par mise en contact avec une solution de NaCl/javel (NaCl 16,6% et d'eau de Javel à 2,6% de Chlore Actif) diluée aux concentrations 1/30, 1/50, 1/70, 1/100, 1/120 et 1/150 dans différents tubes Falcon.

Eau de Javel : Egalement appelé **hypochlorite de sodium**. Lorsque les larves sont mises en contact avec l'eau de javel, les larves se dégainent. En effet, elle détient des propriétés similaires aux sécrétions présentes dans l'estomac des ruminants provoquant ainsi le dégainement des larves.

Dans des tubes cristal bien identifiés sont distribués 750 µL de chaque solution diluée NaCl/Javel et 750 µL de $SL_{2000L3/mL}$. Il faut prélever toutes les 10 min durant 70 min (point de départ : 0 min « T₀ »), 200 µL le contenu du tube cristal (solution larvaire + NaCl/Javel), après avoir homogénéisé la suspension, que l'on transfère dans des tubes Eppendorf de 0,5 ml identifiés (T₀ à T₇₀), dans lesquels 20 µL de lugol



Figure 13. Lugol concentré

concentré (figure 13) auront été préalablement distribués. La **solution de lugol** ou **solution d'iodure de potassium iodée** est composé de **diode** et d'**iodure de potassium** dans de l'eau. Il permet de tuer les larves, ce qui nous permet dans notre cas de visualiser l'état de la larve (gainée ou dégainée au temps T) en stoppant son développement. On retient le temps (T_{60} préférable) et la dilution de javel optimale pour 100% de dégagement.

○ **Mise en contact des larves avec les tanins**

Les larves L3 sont mises en contact avec les tanins. Dans des tubes Eppendorf de 1,5mL identifiés, incubent 0,5mL de solution larvaire à 2000L3/ml avec 0,5mL de TC (pareil pour tous les tanins) à différentes concentrations.

- Pour l'essai préliminaire les concentrations testées sont:

2,5 mg/mL pour toutes les plantes et ainsi que 5,0 mg/mL pour le leucaena.

- Pour l'essai complémentaire i sur les 5 plantes sélectionnées les concentrations testées sont :

Pour le cajou, l'icaque, le goyavier, le manguier et le raisin à des concentrations de 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/mL et 0,05 mg/mL (fig.14).

L'incubation dure 3h à température ambiante sous agitation constante.

Au bout de 3h, les larves sont centrifugées, puis le culot est lavé avec du PBS. L'opération est répétée trois fois. Les larves sont ensuite mises en suspension dans 0.5ml de PBS.

Nous avons préparé une $SL_{2000L3/mL}$, ainsi nous avons 2000 larves L3 pour 1mL. Lors de la mise en contact avec les tanins, 0,5mL de solution larvaire a été mise en contact avec la solution de tanin, donc on obtient 1000 L3 pour 0,5mL. Puis, lors du test de dégagement, on prélève 100 μ L des 0,5mL de larves en suspension dans du PBS (ayant eu contact avec les tanins) dans 5 tubes Eppendorfs (5 répétitions), ainsi on obtient 200 L3/mL ($1000 / 5 = 200$). Pour que les résultats soient représentatifs, il faut obtenir au moins 100 L3 par tube.

○ Test de dégainement

L'essai préliminaire a été réalisé sur des larves âgées de 2 mois, tandis que le deuxième essai sur des larves de 12 jours.

▪ Essai préliminaire

Les larves sont soumises au processus artificiel de dégainement par mise en contact avec une solution NaCl/Javel diluée à la concentration défini lors de la mise au point.

Dans des tubes Eppendorf de 0,5mL sont distribué 100µL de solution larvaire (selon les différentes concentrations de tanins) et 100µL de dilution. Pour chaque concentration de tanin, nous avons fait 5 répétitions, ainsi pour une concentration de tanin, on répartit dans 5 tubes Eppendorf de 0,5mL, 100µL de larves mise en contact avec le tanin (les tanins ne sont plus présents, car les larves ont été lavées) et 100µL de dilution (figure 14). Normalement par la suite, les tubes doivent être mis en agitation constante pendant la durée déterminée lors de la mise au point. En plus des TC testés, un contrôle négatif (L3 dans PBS) a été exécuté en parallèle. Cependant, les tubes Eppendorf de 0,5mL que nous avions étant de forme conique, ce qui empêchait l'homogénéisation de la solution (larves + tanins), car le volume contenu restait au fond du tube. Ainsi, nous avons agité toutes les 10 minutes les tubes au vortex dès l'ajout de la dilution NaCl/Javel. Au bout du temps imparti (temps déterminé lors de la mise au point), 20µL de lugol est ajouté (tue les larves). Dans chaque tube Eppendorf, nous devons obtenir au moins 200 larves.

On observe la tendance du dégainement des larves au microscope à un grossissement de 40, sur une plaque où l'on répartit le volume de chaque tube en 11 gouttes de 20µL (figure 15).

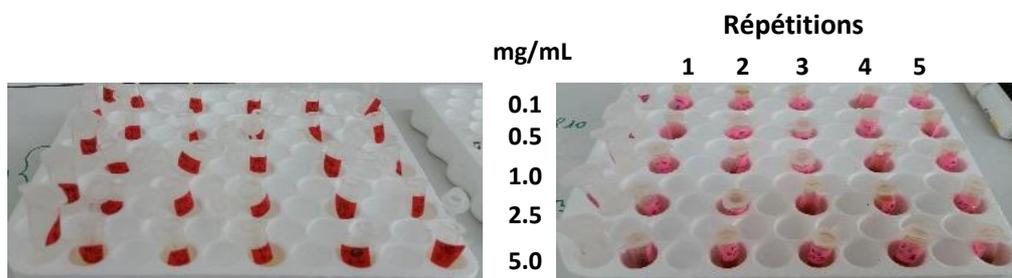


Figure 14. Test de dégainement (manguier et raisin).

Sur la photo, pour le manguier (à gauche), pas de lugol et pour le raisin (à droite), présence de lugol.



Figure 15. Plaque pour comptage des larves (test de dégagement après contact avec les tanins)

- Essai sur les 5 plantes sélectionnées

La même procédure que lors de l'essai préliminaire a été réalisée sur les tanins condensés des 5 plantes (cajou, goyavier, raisinier, manguier et icaquier).

Analyses statistiques

Une fois le comptage des larves terminé lors du test de dégagement, on calcule le pourcentage de dégagement pour chaque répétitions de chaque tanins. On évalue ainsi le taux d'efficacité des TC des plantes. Si le pourcentage est proche de 0%, cela signifie que les TC ont de l'effet, si au contraire il tends vers 100%, c'est qu'ils n'ont aucun effet, ils suivront alors la même tendance que pour le témoin négatif.

Les données des tests de dégagement et la CI 50 (Concentration Inhibitrice) ont été analysées et calculées pour toutes les plantes présentant un effet-dose. La CI 50 est la dose requise pour inhiber à 50% le dégagement des larves et inhiber à 50% le développement larvaire. La détermination de la CI50 par la méthode statistique Probit (figure 18)

III. Résultats et discussion

Essai préliminaire

Le premier essai consiste à tester l'efficacité des tanins des 7 plantes sur le dégainement des larves, afin de cibler celles qui présentent les plus grands taux de rendement.

Le test préalable à la concentration de 2,5mg/ml montre que les tanins de leucaena et de Goyavier (Figure 16) ne sont pas efficaces à la concentration maximale du test (non différents du témoin négatif PBS). Il n'est donc pas nécessaire de poursuivre les essais sur les plus faibles doses avec ces 2 plantes.

En effet, en comparant le témoin PBS avec les plantes, nous pouvons remarquer que lorsque que le pourcentage de dégainement des larves L3 post-incubation est voisin de 0%, cela signifie que les tanins de ces plantes ont un effet positif (Goyavier, Raisin, Icaque, Manguier et Cajou), c'est-à-dire que les larves restent gainées (figure 2.1). En revanche, lorsqu'il est proche de 100%, cela veut dire que les tanins des plantes ne présentent aucun effet sur le dégainement des larves, ainsi nous retrouvons les larves dégainées (figure 2.2) (Leucaena et Grenade). Le témoin PBS contient des larves qui n'ont pas été mises en contact avec les tanins et ces larves sont ensuite soumises au test de dégainement avec une dilution de javel. Donc elles se dégainent au bout d'un certain temps en fonction de la dilution de javel.

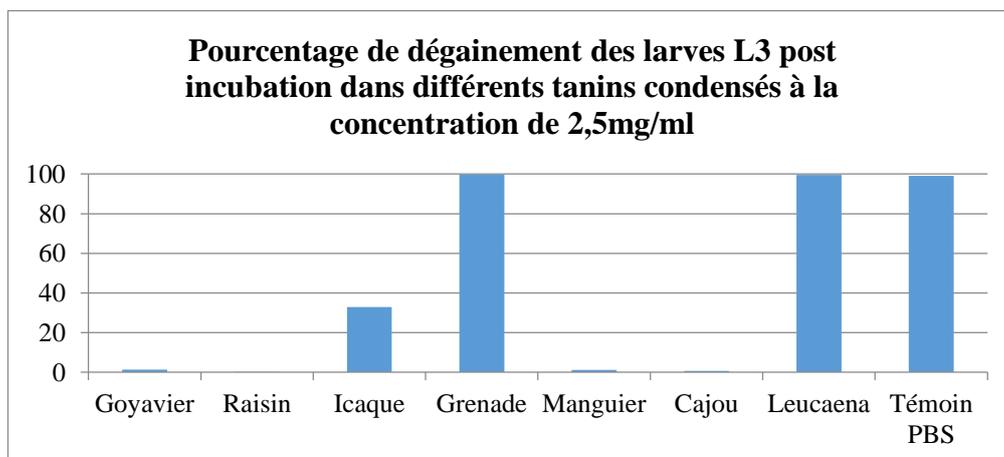


Figure 16. Effet des tanins condensés de 7 plantes sur le dégainement des larves L3 d'*Haemonchus contortus* à la concentration de 2,5 mg/ml

Essais sur les 5 plantes sélectionnées

Pour la suite il a été décidé de poursuivre les essais sur les 5 autres plantes ayant présenté un effet à forte dose, afin de déterminer les efficacités, les effets doses et calculer les DL50.

○ Efficacité et effet doses

Les efficacités moyennes des différents tanins sur le dégagement larvaire d'*Haemonchus contortus* et leurs groupements sont présentées dans le tableau 1. Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes. Les effet-doses sont présentés sur la figure 17.

Tanin Condensé	%efficacité corrigé par le témoin	Erreur Standard	Groupement
Cajou	75,5	2,503	c
Goyavier	41,4	2,503	b
Icaque	16,1	2,503	a
Manguier	39,2	2,503	b
Raisin	43,5	2,503	b

Tableau 1. Efficacité globale des tanins condensés relativement au témoin négatif. Comparaisons.

Les résultats montrent que tous les tanins condensés sont efficaces. Le TC le plus efficace est celui de cajou (tableau 1), et le moins efficace est celui d'icaque. Tous les tanins présentent des effets doses (Figure 17).

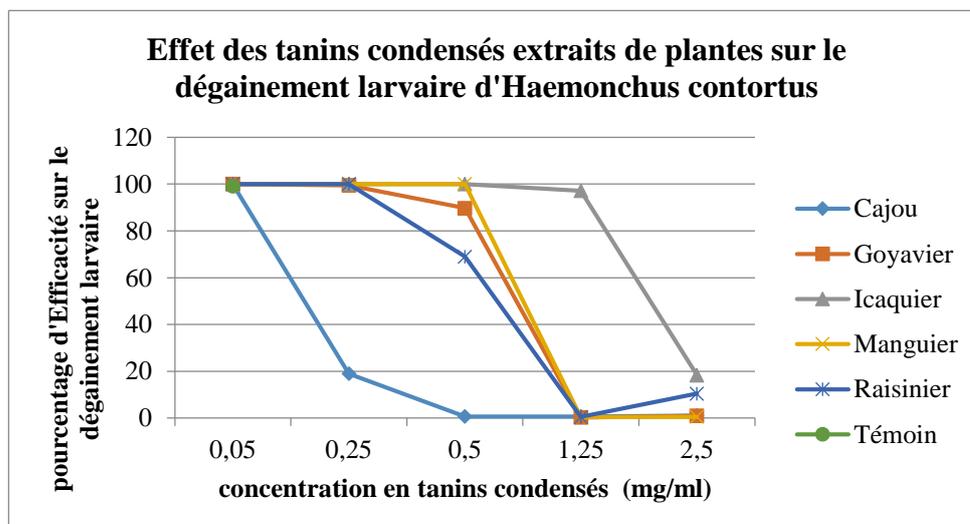


Figure 17. Effet –dose de tanins condensés sur le dégagement larvaire du parasite *Haemonchus contortus*

Selon la figure 17, le TC de l'icaque est efficace à la concentration de 2,5mg/mL, mais ne l'est plus à partir de 1,25mg/mL. Les TC du goyavier, du manguier et du raisinier sont semblables, car ils sont efficaces à 2,5 et 1,25mg/mL, mais n'ont presque plus d'effet, voire aucun effet à partir de 0,5 mg/mL. En revanche le TC du cajou lui est efficace jusqu'à la concentration de 0,25mg/mL, mais n'a plus d'effet à 0,05mg/mL.

○ **Détermination de la CI50**

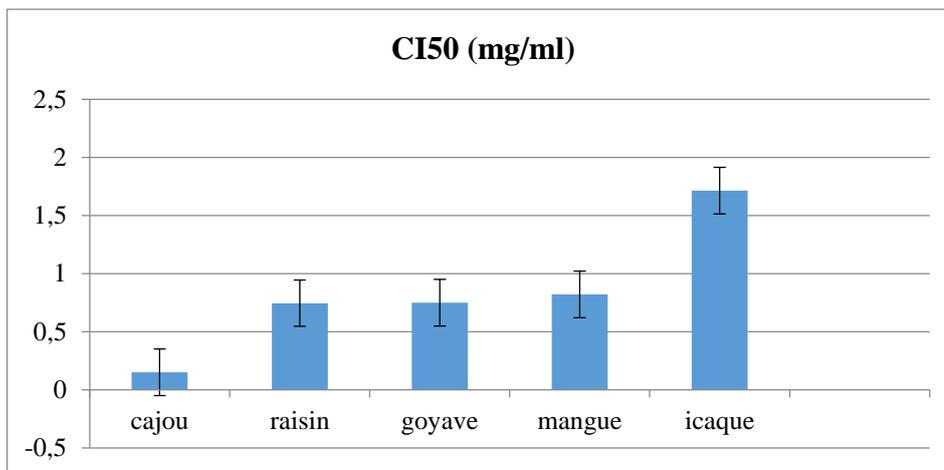


Figure 18. Concentration Inhibitrices 50 (CI50) sur le dégagement des larves L3 d'*Haemonchus contortus* pour les tanins condensés de 5 plantes

La figure 18 montre que le tanin de cajou est le plus efficace, ceux de raisinier, goyavier et manguier sont équivalents et que le moins efficace est celui d'icaque. Ces résultats confirment ceux obtenus concernant l'efficacité.

Dans la littérature, il a déjà été montré que l'efficacité des TC peut varier d'une plante à une autre. Cette variabilité est liée à trois catégories de facteurs: 1) à l'hôte, 2) aux ressources botaniques exploitées et 3) aux parasites (l'espèce ou stades parasitaires), (Quijada J, 2015). Il a également été prouvé que l'efficacité des TC peut varier en fonction de leur structure et de leur poids moléculaire (et du degré de polymérisation) et de leur conformation.

Pour pouvoir faire un anthelminthique à bases de ressources végétales locales, il faudrait donc poursuivre l'étude en réalisant des tests *in vivo* afin de déterminer les doses à administrer (la posologie).

IV. Conclusion – Perspectives

L'objectif de l'étude était d'évaluer l'effet anthelminthique de différents tanins condensés sur le dégainement des larves L3 du parasite *Haemonchus contortus*.

L'étude a montré que les tanins des plantes testées avaient des effets différents, reflet de leur nature et /ou structures diverses, compte tenu de leur complexité.

Il serait intéressant de compléter l'étude par une caractérisation fine de la structure des tanins, afin d'expliquer les résultats obtenus.

Dans le but de produire des anthelminthiques à base des tanins condensés efficaces, d'autres études doivent également être menées afin de définir les doses exactes de tanins condensés à administrer.

Apport personnel du stage

Avoir pu effectuer mon stage au sein de l'Unité de Recherche Zootechnique de l'INRA Antilles-Guyane m'a permis de me familiariser avec le monde professionnel. J'ai pu comprendre l'importance des études réalisées visant à l'amélioration des techniques et surtout de réaliser à quel point le temps dont nous disposons pour les exécuter est précieux. J'ai eu une vision plus professionnelle et moins théorique et beaucoup moins scolaire des travaux pratiques en laboratoire. Pour travailler dans ce domaine, il faut savoir être dynamique, précis, concentré, adroit et faire le moins d'erreurs possible.

Encadrée par Mme CHEVRY MARIE-MAGDELEINE Carine et Mme SILOU-ETIENNE Tatiana, j'ai appris de nouvelles techniques d'analyse et/ou de recherche utilisées dans le domaine de la biochimie telles que les tests anthelminthiques, dans mon cas le **test LEIA (Larval Exsheatment Inhibition Assay ou Test d'inhibition du dégainement larvaire)**. J'ai pu au cours de ce mois de stage participer à un réel projet de recherche et ainsi avoir un esprit critique sur les travaux réalisés et les résultats obtenus afin de pouvoir répondre de manière concrète à une problématique. J'ai également découvert les difficultés auxquelles les chercheurs font face et la manière dont ils doivent s'adapter en n'importe quelle situation.

Malgré la courte durée de ce stage, j'ai pu évacuer toute pensée négative envers les laboratoires de recherche. En ayant un but précis, la motivation est bien plus forte. J'ai trouvé très intéressant de travailler sur de réels problèmes. Mes choix pour la suite de mes études ont pu s'affiner grâce à cette expérience très enrichissante et j'ai ainsi pu avoir un aperçu des perspectives de ce type d'organisme.

Références bibliographiques

- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L.,** 2001. Direct anthelmintic effects of condensed annins towards different gastrointestinal nematodes of sheeo : *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 99, 205-219.
- Aumont, G., Pouillot, R., Simon, R., Hostache, G., Varo, H., Barré, N.,** 1997. Parasitisme digestif des petits ruminants dans les Antilles françaises. *INRA Production Animale* 10(1), 79-89.
- Da Cruz, D.G., da Rocha, L.O., Arruda, S.S., Palieraqui, J.G.B., Cordeiro, R.C., Santos Junior, E., Molento, M.B., de Paula Santos, C.,** 2010. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology* 170, 340-343.
- François, D., Jacquet, P., Moreno, C., Astruc, J.M.,** 2014. Sélectionner la Résistance au Parasitisme gastro-intestinal.
- Quijada J.,** 2015. Relation/activité de tanins bioactifs contre les Nématodes Gastrointestinaux (*Haemonchus contortus*) parasites des petits ruminants. 54-.
- Hansen, J., Perry, B.,** 1995. Epidémiologie, diagnostic et prophylaxie des helminthiases des ruminants domestiques. 174.
- 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.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O.,** 2006. The effects of tanninrich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in parasitology* 22, 253-261.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A.,** 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary parasitology* 186, 18-27.

- Issautier Marie-Noëlle**, L'homéopathie pour les ruminants, Paris, Editions France Agricole, 384, 2009.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N.**, 2012, An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70-78.
- Mahieu, M.**, 2014. Gestion du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants en zone tropicale humide. Université de Lorraine, Nancy.
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H.**, 2010. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology* 173, 85-92.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Hoste, H., Ferre, I.**, 2013. In vitro effect of heather (*Ericaceae*) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 197, 235-243.
- Paolini, V., Dorchie, Ph., Athanasiadou, S., Hoste, H.**, 2002. Effect of condensed tannins and tanniferous plants on gastrointestinal parasitism of goats by nematodes. *Renc. Rech. Ruminants*, 8, 204.
- Peter H. Raven, Ray F. Evert, Susan E. Eichhorn**, *Biology of Plants*, 1999. 924.
- 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.
- Schneider A., Huygue C.**, 2015, Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Editions Quae, 38, 512.
- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar Ordaz, J.A.**, 2012, Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 189, 89-96.