



HAL
open science

Evaluation in vitro de l'activité anthelminthique d'extraits de plantes médicinales sur *Haemonchus contortus* résistant aux anthelminthiques synthétiques

Kassandra Sheikboudou

► To cite this version:

Kassandra Sheikboudou. Evaluation in vitro de l'activité anthelminthique d'extraits de plantes médicinales sur *Haemonchus contortus* résistant aux anthelminthiques synthétiques. [Stage] France. Université des Antilles - Site de Guadeloupe (UA), FRA. 2016, 25 p. hal-02796461

HAL Id: hal-02796461

<https://hal.inrae.fr/hal-02796461>

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

UFR Sciences Exactes et Naturelles

Année universitaire 2015/2016

Evaluation *in vitro* de l'activité anthelminthique d'extraits de plantes médicinales sur *Haemonchus contortus* résistant aux anthelminthiques synthétiques

Sheikboudhou kassandra
L3 Biologie, Biochimie
Biologie science de la santé



Photos 2: Ovin (Blackbelly)



Photos 1: *Haemonchus contortus* (L3)

Stage effectué du 11/01/16 au 06/02/16

Unité de recherche zootechnique

Centre INRA, Antilles-Guyane Domaine de Duclos,
Prise-d'eau, 97170 Petit-Bourg

Maitre de stage : Madame Marie- Magdeleine Carine

Tuteur : Monsieur Philibert Lucien

Remerciements

Je tiens à remercier toute les personnes qui ont contribué à la réalisation de mon stage et aidé lors de la rédaction de ce rapport.

Trouver un stage de 4 semaines n'ayant pas été facile, je remercie particulièrement Mme CHEVRY MARIE-MAGDELEINE Carine, d'avoir accepté d'être ma tutrice, pour son encadrement et ses conseils pour la rédaction du rapport et pour sa gentillesse.

Je tiens également à M. PHILIBERT Lucien pour son encadrement, l'aide à la rédaction du rapport et sa patience. Merci également à tous les autres techniciens de laboratoire : Mme CALIF Suzitte, Mme SILOU Tatiana, Mme FEUILLET Dalila, et M.FELICITE Yoann pour l'aide apportée lors des moments d'hésitation.

Je remercie grandement les autres stagiaires et thésards pour l'ambiance qui m'a permis d'être plus détendue. J'ai pu apprendre beaucoup grâce à vous et j'ai surtout été conforté dans mon projet professionnel, ce qui est un aboutissement de mon cursus universitaire.

Présentation de l'organisme d'Accueil : l'INRA

L'Institut National de la Recherche est un établissement public à caractère scientifique et technologique placé sous la tutelle du ministère chargé de la recherche et du ministère chargé de l'agriculture. Il a créé en 1946.

Les recherches de l'INRA s'articulent autour de différentes thématiques :

- Agriculture durable
- Alimentation et santé
- Chimie verte
- Economie et société
- Equilibres alimentaires mon-diaux
- Génétique
- Réchauffement climatique
- Ressources et milieux naturels
- Santé des animaux
- Santé des plantes

L'Unité de Recherches Zootechniques (URZ), située à Petit-Bourg, est intégrée à un ensemble de 3 unités qui composent la station de zootechnie et comportant 57 agents permanent dont 16 scientifiques et ingénieurs. L'URZ est donc associée à 2 unités expérimentales : le domaine de Gardel en Grande Terre qui accueille les expérimentations en production bovine et caprine sur le pâturage et en pathologie parasitaire et l'unité expérimentale en production et santé animale au domaine de Duclos. Les travaux de l'URZ concernent la proposition d'alternatives pour la conception biotechnique de systèmes d'élevage agro-écologiques en milieu tropical humide. Il s'agit de produire des connaissances et des technologies au service d'une agriculture "productive et durable" dont la nuisibilité environnementale et la nocivité des produits sont réduites, et ce conformément aux principes de l'agro-écologie. Par ailleurs, l'URZ est engagée dans la gestion des ressources génétiques animales locales, en relation les organismes de sélection et les organisations professionnelles.

Sommaire

Remerciements	1
Présentation de l'organisme d'accueil	2
Résumé	4
I. Introduction	5
1. Description de l'Haemonchus contortus	5
2. Cycle de développement du parasite	6
3. Pathologie.....	7
4. Différents modes de traitements du parasitisme gastro intestinal	8
5. Phytothérapie	10
6. les Tanins : Plantes testées.....	11
II. Matériels et Méthodes	14
1. Test de développement larvaire (LDA).....	14
a) Extraction des œufs de larves et mise en culture jusqu'au stade L1	14
b) Préparation des solutions de plantes et des témoins	15
c) Distribution dans les boîtes de cultures des solutions.....	16
d) Lecture des résultats	16
III. Résultats et discussions	17
IV. Conclusion et Perspectives	20
V. Apport personnel du stage	21
Annexes	22
Références bibliographiques	23

Résumé

L'objectif de ce stage était d'évaluer *in vitro* l'activité anthelminthique d'extraits de plantes tropicales (*Leucaena*, Pois d'Angole) sur le développement larvaire du parasite *Haemonchus contortus* résistant aux anthelminthiques de synthèse.

Le test de développement larvaire (LDA) permet d'observer ou non le développement des larves du stade L1 au stade L3 en mettant en contact des larves L1 avec des extraits de plantes contenant des tanins condensés..

L'étude a montré que les tanins condensés du pois d'angole et du *Leucaena* inhibent le développement de souches du parasite résistantes aux anthelminthiques de synthèse avec des effets différents observés, reflet de la nature et /ou structures diverses des TC.

Les plantes à TC sont donc une solution pour la lutte contre la résistance des parasites aux anthelminthiques de synthèse. Il serait intéressant de compléter l'étude par une caractérisation fine de la structure des tanins, afin d'expliquer les résultats obtenus, ainsi que par des études *in vivo*.

Mots clés : *Haemonchus contortus*, anthelminthique, *Leucaena*, Pois d'Angole, Tanins condensés.

I. Introduction

Aux Antilles, le parasitisme gastro-intestinal est un problème majeur pour les éleveurs de caprins et d'ovins, affectant la santé de l'animal en causant un manque d'appétit, diarrhée, anémie pouvant aller jusqu'à la mort de l'animal. Afin de remédier à ce problème des traitements anthelminthiques chimiques (benzimidazoles et lactones macrocycliques) ont été développés. Cependant leur utilisation répétée et prolongée a entraîné une résistance des parasites, ce qui crée des pertes importantes au sein du troupeau, entraînant un manque à gagner non négligeable pour les éleveurs. Ainsi, afin de lutter contre le parasite et de rassurer les consommateurs par rapport à la qualité de la viande (produits chimiques ingérés), l'INRA URZ travaille à d'autres moyens dont la phytothérapie, qui valorise l'usage des plantes dans l'alimentation des ruminants (aliments). En effet, les plantes contiennent des métabolites secondaires qui peuvent leur conférer des propriétés anthelminthiques. Les tanins condensés(TC) font partie des métabolites secondaires des plantes qui peuvent permettre de lutter contre le parasitisme gastro-intestinal (Hoste et al, 2006). L'effet des TC a déjà été mis en évidence in vitro sur des souches sensibles du parasite (Hounzangbe-Adote et al, 2005).

A l'URZ, des tests ont déjà été effectués (Marie-Magdeleine, 2009) avec divers extraits de plantes tropicales qui ont été décrit comme ayant des propriétés anthelminthiques contre le parasite *Haemonchus contortus*. L'URZ travaille à l'étude de l'effet des TC sur des souches résistantes du parasite. Des premiers essais ont été menés sur les plantes tels que : le Manioc, le *Leucaena* et le Pois d'Angole. C'est dans ce cadre que se situe l'étude qui sera conduite pendant le stage. L'objectif est de compléter les travaux de l'URZ en testant l'effet des tanins condensés (TC) des plantes sélectionnées sur le développement larvaires L1 à L3 de deux souches d'*Haemonchus contortus* résistantes aux produits anthelminthiques de synthèse.

I.1. Description du parasite *Haemonchus contortus*

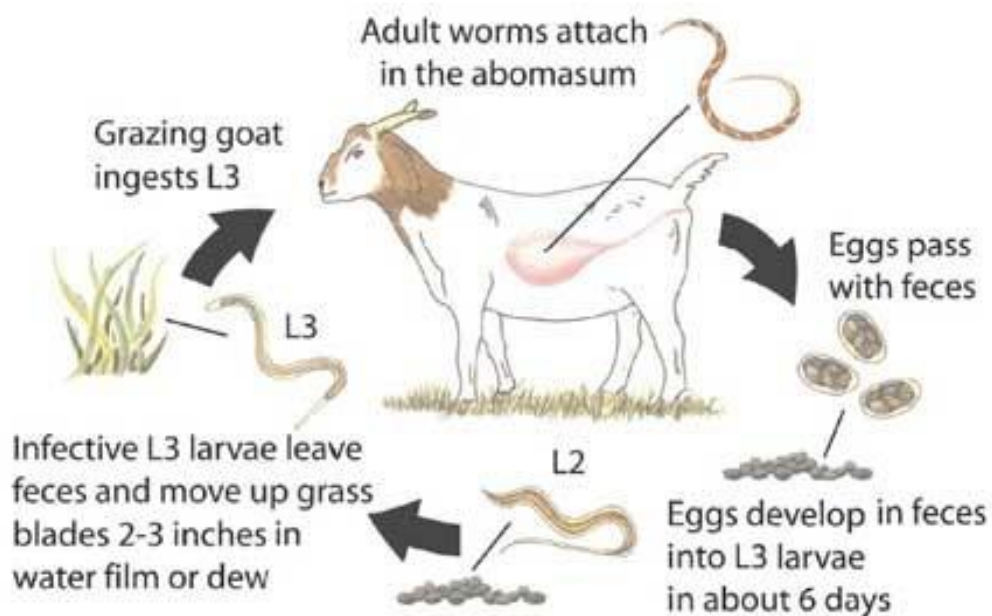
Le parasite *Haemonchus contortus* fait partie de la famille des Trichostrongles, sa classification a été établie par Durette-Desset et Chabaud (1993). Il fait partie de la Classe des Nématodes, sa Sous-Classe est la *Secernentea*, la Superfamille: *Trichostrongyloidea*, et la Famille: *Trichostrongylidae*.

La majorité des strongles gastro-intestinaux des ruminants appartiennent à la famille des *Trichostrongylidae*, subdivisée en quatre sous-familles (*Haemonchinae*, *Trichostrongylinae*, *Ostertagiinae* et *Cooperiinae*).

Haemonchus contortus est une espèce qui fait partie de la sous famille *Haemonchinae*, localisé dans la caillette des petits ruminants (ovins et caprins). *Haemonchus contortus* est un hématoophage qui peut mesurer de 10 à 30mm de long et 0.4 à 0.6mm de diamètre.

I.2. Cycle de développement Général

Le parasite *H. contortus* a un cycle monoxène (le développement s'accomplit chez un seul hôte) qui se compose de 2 phases: une phase libre en milieu extérieur allant de l'éclosion des œufs au stade larvaire L3 infestant (développement exogène) et une phase parasitaire chez l'hôte où ont lieu le développement du stade L3 au stade adulte (développement endogène).



Life Cycle of *Haemonchus contortus*, the barber pole worm

Schéma 1: Cycle de développement larvaire. (Source : Fernandez D et al, 2011)

➤ Phase exogène

La phase libre débute avec l'élimination d'œufs pondus par les vers femelles dans les matières fécales de l'hôte. Ces œufs s'embryonnent, donnant naissance à des larves de stade 1 (L1) au bout de 48h qui muent ensuite en 1 ou 2 jours en larves L2. Ces deux premiers stades se nourrissent de matières organiques et de micro-organismes des matières fécales, et sont peu résistants dans le milieu extérieur ce qui explique un taux de mortalité très élevé. Les larves L2 évoluent ensuite en larves infestantes L3 au cours d'une deuxième mue incomplète. Les larves de stade L3 sont très résistantes dans l'environnement puisque protégées par leur exuvie. Elles peuvent survivre plusieurs mois sur une pâture grâce à leurs réserves lipidiques. La durée de la phase libre dépend étroitement des conditions de température et d'humidité ambiantes (température supérieure à 18°C et degré d'humidité plus de 70%). L'évolution de l'œuf en larve L3 s'effectue généralement en 8 à 10 jours. Pour *H. contortus*, cette évolution peut se faire plus rapidement (5-6 jours).

➤ Phase endogène

La phase parasitaire proprement dite commence par l'ingestion des larves L3 par l'hôte lors du pâturage. Ces larves vont perdre leur exuvie lors du passage dans le rumen puis vont migrer dans la muqueuse digestive. Les larves L3 y subissent alors une nouvelle mue en larves L4. A ce stade, il est fréquent que les larves s'enkystent dans la muqueuse digestive et retardent leur développement. Les larves L4 évoluent alors en stade L5 dits juvéniles, avant de donner des adultes (mâles et femelles). Après fécondation, les femelles pondent des œufs qui sont excrétés dans les matières fécales de l'hôte et deviennent une nouvelle source de contamination du pâturage. La durée comprise entre l'ingestion des larves infestantes et la ponte par des femelles se définit comme la période prépatente; en l'absence d'hypobiose au stade L4, celle-ci est d'environ 3 semaines (Lacroux.C, 2006)

I.3. Pathologie

Ce parasite, hématophage dès le stade L4, est responsable de pertes importantes de production dans les élevages de petits ruminants dégradation de l'état général des animaux, troubles digestifs avec diarrhée et perte de poids, laine de mauvaise qualité, altération des capacités de reproduction mais également de mortalité par anémie, notamment chez les agneaux.

L'haemonchose se manifeste essentiellement par un syndrome d'anémie et on peut distinguer plusieurs types :

- Haemonchose suraiguë : forme peu fréquente, liée à des infestations massives chez des animaux apparemment en bonne santé, qui meurent de façon subite d'une gastrite hémorragique sévère.
- Haemonchose aiguë : forme typique, caractérisée par une anémie avec chute progressive et dramatique de l'hématocrite, survenant généralement deux semaines environ après l'infestation ; malgré une stimulation compensatrice de l'érythropoïèse, la moelle osseuse est rapidement dépassée et l'hématocrite chute jusqu'à la mort de l'animal. Le phénomène est également aggravé par la perte continue en protéines et en fer.
- Haemonchose chronique : forme la plus fréquente, à l'origine des pertes économiques les plus importantes en raison d'une morbidité élevée. Elle apparaît de façon discrète et insidieuse et aboutit à une dégradation de l'état général rappelant la malnutrition.

I.4. Différents modes de traitements chimiques du parasitisme gastro intestinal

Il existe à ce jour trois grandes familles de molécules anthelminthiques efficaces contre les strongles gastro-intestinaux des ovins (Lanusse et Prichard, 1993) : les benzimidazoles, les imidazothiazoles et les lactones macrocycliques.

A cela, s'ajoute la famille des salicylanilides, molécules actives contre les strongles hématophages.

Le tableau 1 présente ces différentes molécules, les posologies recommandées chez les ovins et les contraintes d'utilisation (temps d'attente pour la consommation des viandes et abats et du lait).

Les benzimidazoles agissent en bloquant certains systèmes enzymatiques du métabolisme anaérobie des parasites, les privant ainsi de leurs ressources énergétiques (Prichard, 1973), mais également en inhibant la formation des microtubules du cytosquelette des parasites, sans altérer ceux de l'hôte (Lacey, 1988 ; Martin et al, 1997). Le lévamisole (famille des Imidazothiazoles) est un agoniste de l'acétylcholine ; en se fixant sur les récepteurs nicotiniques du parasite, il entraîne une paralysie spastique de celui-ci et sa mort (Martin, 1993 et 1997 ; Kohler, 2001). Cette molécule n'a en revanche aucun effet sur les larves inhibées. Les salicylanilides sont actifs contre les strongles hématophages (*H. contortus*); ils inhibent la phosphorylation oxydative du parasite sans affecter celle de l'hôte (Swan, 1999). Ces molécules présentent la particularité de se fixer à l'albumine plasmatique, ce qui leur confère une importante rémanence (Rothwell et al, 2000). Les lactones macrocycliques comprenant l'Ivermectine (Blackhall et al, 2003). Elles sont agonistes du récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique et du récepteur au glutamate. Elles entraînent une paralysie flasque du parasite en augmentant la perméabilité membranaire aux ions chlorures.

L'utilisation excessive des molécules chimiques a généré des résistances. En vue des contraintes qu'engendrent ces molécules et notamment une résistance des parasites, une alternative est alors envisagée avec l'utilisation de plantes.

I.5. Phytothérapie

La phytothérapie est basée sur l'utilisation des propriétés pharmacologiques naturelles des molécules organiques (glucides, acides, lipides, stéroïdes, vitamines et élément minéraux) élaborées par les plantes, qui sont des métabolites indispensables au maintien de l'intégrité cellulaire et la croissance des organismes (métabolites primaires).

Elle est aussi basée sur l'utilisation des métabolites secondaires. Ce sont des molécules qui ne sont pas directement impliquées dans les processus de croissance des organismes vivants contrairement aux métabolites primaires. Chez les végétaux, ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédateurs d'insectes, sécheresse, lumière UV ...) (Lacroux.C, 2006).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales. L'activité anthelminthique des plantes est liée à la présence de certains types de métabolites secondaires. Leur concentration varie en fonction des conditions agronomiques, de récolte et de conservation. Les métabolites secondaires sont fragiles (sensibles à la température, l'humidité, ...). On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les alcaloïdes et composés azotés (cochicine, caféine...)
- Les composés terpéniques (isoprénoïdes...)
- Les composés phénoliques (acide cinnamique, flavonoïdes, acide salicylique, tannins...)

Auxquelles on peut ajouter :

- la catégorie des hétérosides, constituée de dérivés glycosylés de composés terpéniques, phénoliques et plus rarement d'alcaloïdes. Ces glycosylations affectent largement leurs propriétés biochimiques (dont l'extractibilité dans différents solvants) mais également leurs effets biologiques (toxicité, propriétés pharmacologiques).
- les molécules désignées sous le terme de « composés mixtes » ou « composés d'origine mixte », qui correspondent à des condensations de molécules provenant des catégories citées plus haut.

I.6. Les Tanins condensés et les plantes testées

Les tanins sont des métabolites secondaires, ils se retrouvent dans toutes les parties de la plante (racine, écorce, feuilles etc.). Ce sont des composés polyphénoliques hydrosolubles de structure variée, caractérisés par des propriétés astringentes. Ils possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et hypoglycémiantes. Les tanins ont pour effet principal, pour les plantes, de les rendre peu digestibles. Les acides phénoliques libres dans les cytoplasmes des cellules empêchent la digestion, par les herbivores (insectes surtout et leurs larves, chenilles essentiellement), des tissus végétaux en bloquant leurs enzymes digestives. On distingue de manière générale les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

De nombreuses plantes contiennent des mélanges complexes de tanins condensés (TC) et hydrolysables, dont la teneur varie en fonction des espèces et variétés végétales, de la partie végétale considérée, de leurs stades végétatifs et des conditions environnementales (Min et Hart, 2002).

Les tanins condensés des plantes peuvent présenter divers effets biologiques sur l'animal qui les ingère. Les effets des tanins condensés sur le parasitisme gastro-intestinal ont été étudiés chez des ovins infestés in vitro et in vivo (Niezen et al, 1994, 1995, 1998a et b ; Robertson et al., 1995 ; Marley et al., 2003).. L'ingestion de légumineuses contenant ces molécules est associée à de meilleures résistances (la capacité de l'hôte à réguler l'installation, le développement, la fécondité et la survie des nématodes (Douch et al, 1996)) et résilience (la capacité de l'hôte à maintenir son niveau de production tout en étant infesté (Albers et al., 1987 ; Bisset et al., 1994)). aux strongles gastro-intestinaux. La consommation de plantes riches en tanins condensés par des ovins infestés par des Trichostrongles a été reliée dans la majorité des cas à une diminution de l'excrétion fécale des œufs, ainsi qu'à une diminution de la charge parasitaire totale (Niezen et al., 2002). Par contre, la fécondité des femelles nématodes ne semble pas affectée par l'ingestion de tanins condensés. Certaines plantes diminueraient significativement le rendement d'éclosion des œufs ainsi que le développement larvaire dans les matières fécales..

Dans le cadre du stage, deux plantes riches en TC seront évaluées pour leurs propriétés anthelminthiques sur les souches résistantes du parasite *Haemonchus contortus* : le pois d'angole (*Cajanus cajan*) et le *Leucaena leucocephala*.

- Cajanus Cajan :



Dessin 3: *Cajanus Cajan*

¹⁶⁷ C'est une espèce de plante vivace de la famille des Fabaceae, connu aussi sous le nom de Pois d'Angole, pois Cajan, pois-congo, Ambrevade, Pwa dibwa et Gandul (Marie-Magdeleine et al, 2015).

. C'est une légumineuse à graines cultivée en régions tropicales semi-arides originaire d'Inde. C'est une plante qui peut atteindre 2 à 4 mètres de hauteur, les fleurs sont jaunes brunâtres et le fruit une gousse linéaire qui renferme plusieurs graines. Elle est très résistante à la sécheresse mais ne supporte pas l'excès d'eau.

Les graines mûres contiennent 20 à 30 % de protéines. Ce sont les tanins qui sont responsables des propriétés anti-diarrhéiques et son action anti-drépanocytaire, anti-inflammatoires et analgésiques, vulnéraires et astringents, diurétiques et vermifuges (2014). Sa teneur en Tanins condensés est d'environ 22%.

- *Leucaena leucocephala* :



Dessin 2: *Leucaena leucocephala*

Nom vernaculaire: Faux mimosa, Faux acacia, Cassie blanc, Zakadi, Monval, Makata. Il fait partie de la famille des Fabaceae (Marie-Magdeleine et al, 2015).

C'est un arbuste originaire d'Amérique Centrale, il peut atteindre 18m de hauteur, donne des fleurs blanches en capitules et globuleuses, et des grappes de gousses brunes plates, de 13 à 18 cm de long et de 15 à 30 graines brunes ovales plus ou moins aplaties. La floraison et la fructification se produisent tout au long de l'année.

Le *Leucaena* est utilisé pour faire du charbon ainsi qu'en fourrage. Son feuillage est riche en protéines (21-26% /matière sèche) et a une teneur assez élevée en fibres (15-25% de cellulose brute/matière sèche). D'un point de vue médical, les feuilles et les graines sont utilisées contre les maux d'estomac, les graines en tant que vermifuges, traitement de la blennorragie(ou gonorrhée) et des troubles visuels (Lisan B, 2012). La teneur en Tanins condensés de ses feuilles est d'environ 12%.

II. Matériels et méthodes :

II.1. Test de Développement Larvaire (LDA, Larval development assay; Hubert et kerbœuf, 1992) :

L'objectif est de tester in vitro l'activité anthelminthique d'extrait de plantes à tanins, ici le Pois d'Angole et *Leucaena*, sur le développement larvaire du parasite *Haemonchus contortus* du stade L1 au stade L3.

a) Extraction des œufs de larves et mise en culture jusqu'au stade L1:

La Récupération des fèces d'ovins infestés expérimentalement par 2 souches différentes de larves L3 d'*Haemonchus* (Combe et Pompilius). Cette infestation a été réalisée préalablement au début du stage en raison de la durée du stage et du début de l'excrétion des œufs dans les fèces après infestation (28 jours).

Le broyage des fèces a été fait avec un moulin à légumes et de l'eau dans un bol en plastique, puis l'utilisation de différents tamis (500, 250, 125, 62, 50 et 32 μm) a permis la récupération des œufs sur le tamis 32 μm dans un bécher car ils ont une taille comprise entre 50 et 32 μm . La solution larvaire est répartie dans des tubes « Falcons ». Ces tubes sont, après vérification des poids, centrifugés à 2800tours/min pendant 15min.

Le surnageant est éliminé puis le culot est remis en suspension avec 35ml de NaCl (d : 1.20), les tubes sont homogénéisés au vortex puis nouvelle centrifugation à 2800tr/min. La densité du chlorure de sodium permet la flottaison des œufs. A l'issue de la centrifugation le surnageant est versé sur un petit tamis de 32 μm dans un pot, ce qui permet de récupérer les œufs. Des rinçages successifs à l'eau du robinet, puis l'eau distillée et enfin à l'eau bi-distillée stérile, permet de laver les œufs et enlever toutes traces de NaCl.

Préparation de la solution larvaire :

La concentration en œufs (C) dans l'eau stérile a été déterminée par comptage de 10 gouttes de 10 μl pour chaque solution. Des plaques de 24 puits ont été utilisées et il a été prévu de distribuer 200 œufs par puits. On avait donc un besoin de 4800 œufs pour

une plaque de 24 puits. La détermination de la concentration larvaire finale a été faite en faisant une estimation de 6000 œufs par plaques.

Le volume Y correspond à 6000 œufs, $Y=6000/C$.

La préparation de la solution pour la souche *Pompilius* a été faite de la manière suivante:

- 338 œufs pour 100µl soit une concentration de 3380 œufs/ml,
- 4 boîtes ont été utilisées soit $Y \times 4 = (6000/3380) \times 4 = 7.08 \text{ml}$:
- on prend le volume correspondant à Y auquel on ajoute 22.5 x4 µl de solution d'Ecoli, 9 x 4µl de fongizone et complété à 15 x4 ml avec du PBS.
- On obtient une concentration de 400 œufs/ml.

La préparation de la solution pour la souche *Combe* a été faite de la façon suivante:

- 96 œufs pour 100 µl, concentration de 960/ml, $Y = (6000/960) \times 4 = 25 \text{ ml}$.
- On prend le volume correspondant à Y auquel on ajoute 22.5 x4 µl de solution d'Ecoli, 9 x 4µl de fongizone et complété à 15 x4 ml avec du PBS.
- On obtient une concentration de 400 œufs/ml.

On a réparti sous agitation dans les puits des boîtes correspondantes 0.5 ml de la solution de chaque souche et on a laissé incuber à température ambiante 24 à 48h.

b) Préparation des solutions de plantes et des témoins :

- Préparation des extraits de plantes :

On a préparé une solution mère à 3mg/ml de pois d'Angole (AL00206) soit 90.2 mg de TC +30ml de PBS.

On a préparé une solution mère de *Leucaena* à 3mg/ml (AL00201) soit 180mg de TC+ 60ml PBS.

Des solutions filles ont été préparées avec du PBS afin d'obtenir des concentrations de 1.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.3 mg/ml et 0.06 mg/ml.

- Témoin négatif : le PBS, Tampon phosphate salin a été utilisé comme témoin négatif.

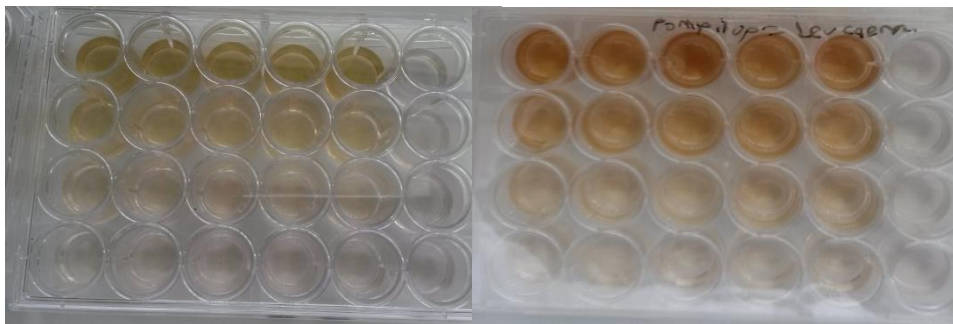
- Préparation du milieu Earle : Dans un bécher de 50ml : on mélange 9 µg d'extrait de levure, 1.7ml d'eau stérile et on a ajusté le pH à 7.2 avec le bicarbonate de soude (NaHCO₃ à 50g/l) et puis filtré sur un filtre de 0.2 µm.

c) **Distribution dans les boîtes de culture des solutions:**

Les solutions larvaires sont réparties sous agitation dans les puits sous un volume de 0.5ml puis laissées à incuber à température ambiante dans les boîtes de culture 24 à 48h. Les boîtes sont observées au microscope afin de vérifier la présence de larve L1.

Si la quantité de L1 est suffisante, on distribue de 70µl de milieu Earle avec une pipette de distribution dans toutes les boîtes de culture. Ajout de 0.5ml de solution d'extrait de plante par puits en suivant le plan d'expérimentation (voir Annexe 1). Pour la souche *Pompilius*, mono-résistante, l'extrait de plantes *Leucaena* et pour la souche Combe, le Pois d'Angole.

Pour chaque souche, dans une autre boîte on répartit le témoin négatif, 0.5ml de PBS.



Photos 3: Boite de culture avec du Pois d'angole

Photos 4: Boite de culture avec du *Leucaena*

d) **Lecture des résultats**

Les boîtes ont été régulièrement observés pendant une semaine et après 8 jours d'incubation à température ambiante, on arrête la réaction dans les boîtes de culture avec le Lugol dilué à 1/6 ème.

Les solutions de chaque puits sont montées sur une ou deux lames de Mac Master et en rinçant le puits au besoin avec quelques gouttes d'eau distillée et on réalise le comptage en distinguant les larves L1/L2 des larves L3.

III. Résultats et discussion :

Efficacité et effet doses

Les efficacités moyennes des différents tanins sur le développement larvaire d'*Haemonchus contortus* et leurs groupements sont présentées dans le **tableau 2**. Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes. Les effet-doses sont présentés sur la **figure 1**, et la concentration conduisant à la moitié de l'effet maximal (CI50) sur la **figure 2**.

Tableau 2 : Efficacité globale des tanins condensés sur les souches mono et multi résistantes du parasite *Haemonchus contortus*, relativement au témoin négatif PBS. Comparaisons.

Souche <i>H. con-</i> <i>tortus</i>	Tanins Condensés/témoin	% efficacité	Erreur Standard	Groupement
Multi Résistante	<i>Leucaena</i>	85,21	0,81	a
	Pois d'angole	78,41	0,90	b
	Témoin négatif PBS	14,00	0,84	c
Mono Résistante	<i>Leucaena</i>	82,20	1,43	a
	Pois d'angole	94,24	1,43	b
	Témoin négatif PBS	15,27	1,69	c

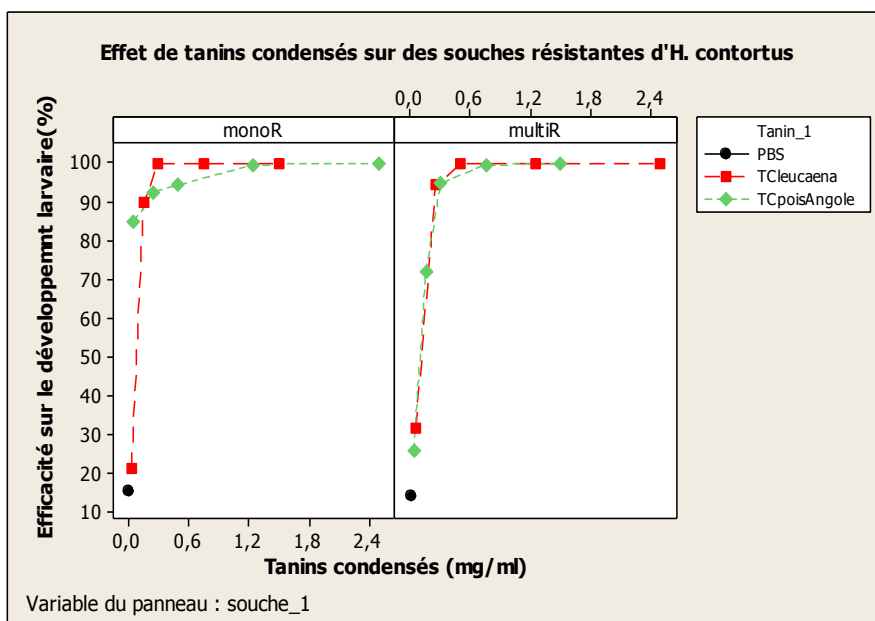


Figure 1 : Effet-dose de tanins condensés de *Leucaena* et de pois d’angle sur le développement larvaire de 2 souches du parasite *Haemonchus contortus*, Mono et multi résistantes aux anthelminthiques.

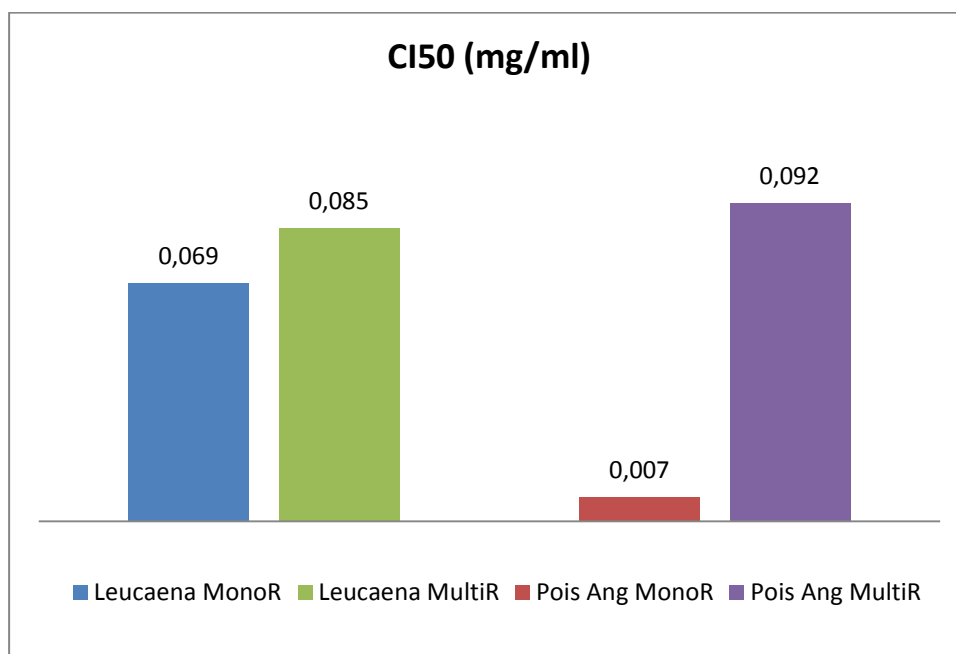


Figure 2 : Concentration Inhibitrice 50 (CI50) sur le développement larvaire de souches résistantes d’*Haemonchus contortus* pour les tanins condensés de *Leucaena* et de pois d’Angole.

Les résultats montrent que les tanins condensés (TC) de leucaena et de pois d'Angole sont efficaces sur les deux types de souches résistantes évaluées. Le TC le plus efficace sur la souche mono résistante (monoR) est celui de pois d'angole, et le tanin le plus efficace sur la souche multi résistante (multiR) est celui de Leucaena (**Tableau 2**).

Les deux TC évalués in vitro présentent des effets doses (**Figure 1**), avec un effet déjà élevé (85%) des TC de pois d'angole sur la souche monoR, à la plus faible concentration testée. La détermination de la CI50 par la méthode statistique Probit (**Figure 2**) montre que le tanin de pois d'angole est le plus puissant sur la souche monoR, appuyant le résultat précédent. Les TC des 2 plantes ont des puissances équivalentes sur la souche MultiR.

Ces résultats laissent aussi penser que des mécanismes d'action différents pourraient être en cause en fonction des souches de parasites. En effet, pour une même plante (pois d'angole) on observe des CI50 très différentes selon la souche. Les deux souches de parasites auraient donc développé des mécanismes de défense différents, entraînant des effets différents des deux plantes : pour la souche multiR les 2 TC ont le même effet, donc le même mécanisme d'action a priori sur cette souche.

Pour la souche monoR, les effets différents des 2 TC montrent un mécanisme d'action différent sur la souche. Cette différence d'effet pourrait s'expliquer par une nature et/ou une structure différente des tanins des deux plantes.

IV. Conclusion et Perspectives

L'objectif de l'étude était d'évaluer l'effet anthelminthique de différents tanins condensés sur le développement larvaire du parasite *Haemonchus contortus* et sur des souches résistantes aux anthelminthiques de synthèse.

L'étude a montré que les tanins condensés des plantes testées avaient des effets positifs sur des souches du parasite résistantes aux anthelminthiques de synthèse. De plus, des effets différents sont observés, reflet de la nature et/ou structures diverses des TC, compte tenu de leur complexité. Les plantes à TC sont donc une solution pour la lutte contre la résistance des parasites aux anthelminthiques de synthèse.

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

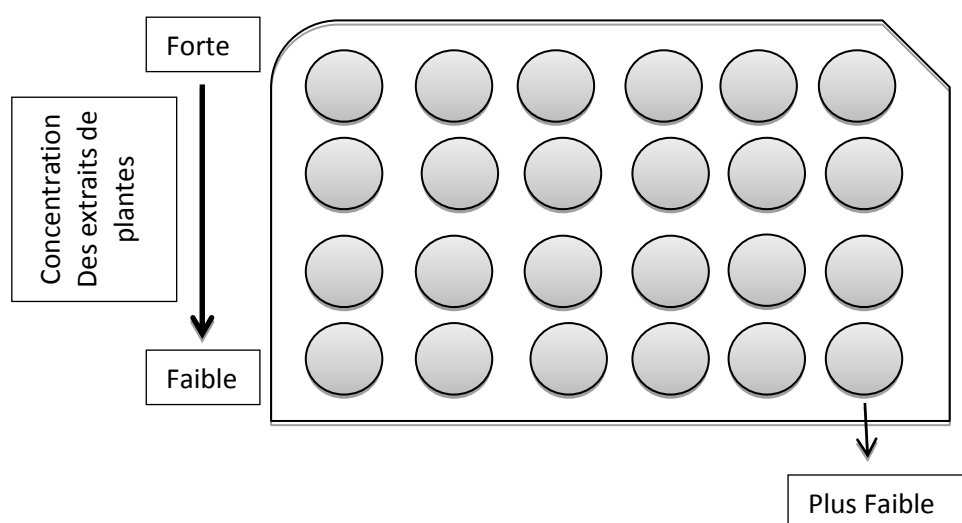
V. Apport personnel du stage

Lors de ce stage, j'ai pu travailler sur un sujet concret d'expérimentation, réalisé sur plusieurs jours. L'utilisation des propriétés médicinales des plantes sur un organisme vivant m'a beaucoup plu et m'a permis de confirmer mon envie de travailler sur les plantes et leurs effets sur le plan médical. Il m'a permis également d'observer les différents avantages et désavantages de la recherche et ainsi spécifier mon projet professionnel.

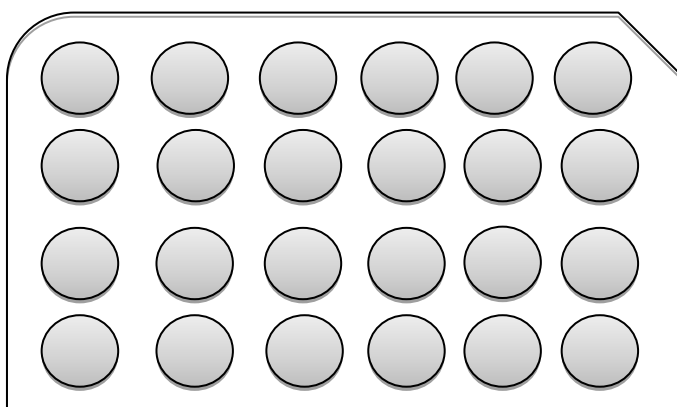
Annexe:

Annexe 1 : Schéma de la distribution des solutions dans les boîtes de culture de 24 puits

Boîte 1 et 2 : Pour la souche mono-résistante (*Pompilius*) + TC leucaena et pour la souche multi-résistante (*Combe*) + TC Pois d'Angole



Boite Témoin négatifs : PBS



PBS

Références bibliographiques

1. Albers, G.A., Gray, G.D., Piper, L.R., Barker, J.S., Le Jambre, L.F., Barger, I.A., 1987, The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young merino sheep. *Int J Parasitol* 17, 1355-1363.
2. Bisset, S.A., Morris, C.A., Squire, D.R., Hickey, S.M., Wheeler, M., 1994, Genetics of resilience to nematode parasites in sheep. *N Zeal J Agric Research* 37, 521-534.
3. Blackhall, W.J., Prichard, R.K., Beech, R.N., 2003, Selection at a gamma-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. *Mol Biochem Parasitol* 131, 137-145.
4. Compléments alimentaires, <http://www.complements-alimentaires.co/pois-dangole/>, visité le 03/02/2016.
5. Douch, P.G., Green, R.S., Morris, C.A., McEewen, J.C., Windon, R.G., 1996a, Phenotypic markers for selection of nematode-resistant sheep. *Int J Parasitol* 26, 899-911.
6. Fernandez David, 2011, Rain Brings Relief, New Problems to Livestock Producers, *Article of Goat & sheep news*, 3, 1- 8.
7. 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.
8. Hounzangbe-Adote, M.S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H., 2005. In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in veterinary science* 78, 155-160.
9. Kohler, P., 2001, The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol* 31, 336-345.
10. Lacey, E., 1988, The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18, 885-936.
11. Lacroux Carine, Juin 2006, Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux dans deux races ovines, Thèse, 13-22.

12. Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993, Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet Parasitol* 49, 123-158.
13. Marie-magdeleine Carine et Archimede Harry, 2015, Brochure Plantes anthelminthiques pour les animaux d'élevage.
14. Marie-magdeleine Carine, Juin 2009, Etude de ressources végétales tropicales pour un usage anthelminthique en élevage de ruminants, Thèse, 15-33.
- 15.
16. Martin, R.J., 1993, Neuromuscular transmission in nematode parasites and antinematodal drug action. *Pharmacol Ther* 58, 13-50.
17. Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J., Lampkin, N.H., 2003, The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Vet Parasitol* 112, 147-155.
18. Martin, R.J., 1997, Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet J* 154, 11-34.
19. Min, B.R., Hart, S.P., 2002, Tannins for suppression of internal parasites. *J Anim Science* 81, 102-109.
20. Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Raufautk, K., Robertson, H.A., McFarlane, R.G., 1994, Lamb weight gain and faecal egg count when grazing one of seven herbage and dosed with larvae for six weeks. *Proceed New Zealand Soc Animal Prod* 54, 15-18.
21. Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A., Waghorn, G.C., 1995, Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *J Agric Science* 125, 281-289.
22. Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G.C., Charleston, W.A., 1998a, Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Vet Parasitol* 80, 15-27.
23. Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Charleston, W.A., 1998b, Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass. *Vet Parasitol* 78, 13-21.
24. Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Graham, T., Carter, J.L., Leathwick, D.M., 2002, The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. *Vet Parasitol* 105, 269-283.

25. Paolini Virginie, Juin 2004, Effets des Tanins condensés sur le Parasitisme par les Nématodes Gastro-intestinaux chez la chèvre, Thèse, 40-83.
26. Prichard, R.K., 1973, The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *Int J Parasitol* 3, 409-417
27. Robertson, H.A., Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Charleston, W.A., Jinlong, M., 1995, The effect of six herbage on liveweight gain, wool growth and faecal egg count of parasitized ewe lambs. *Proceed New Zealand Soc Animal Prod* 55, 199-201.
28. Rothwell, J.T., Lacey, E., Sangster, N.C., 2000, The binding of closantel to ovine serum albumin, and homogenate fractions of *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 30, 769-775.
29. Swan, G.E., 1999, The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. *J S Afr Vet Assoc* 70, 61-70.