



Caractérisation du parasite *Haemonchus contortus* pour sa résistance aux produits anthelminthiques de synthèse et sa sensibilité aux tannins condensés

Rachelle Bernier

► To cite this version:

Rachelle Bernier. Caractérisation du parasite *Haemonchus contortus* pour sa résistance aux produits anthelminthiques de synthèse et sa sensibilité aux tannins condensés. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-02960384

HAL Id: hal-02960384

<https://hal.inrae.fr/hal-02960384>

Submitted on 7 Oct 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.

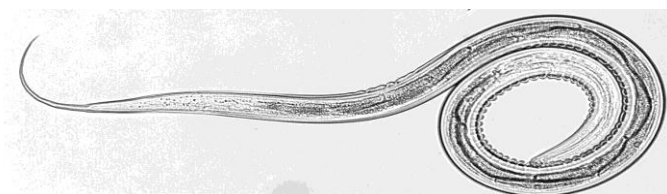
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DES ANTILLES
Faculté des Sciences Exactes et Naturelles

MASTER DE BIOLOGIE SANTE EN MILIEU TROPICAL

Mémoire de deuxième année

**CARACTÉRISATION DU PARASITE *HAEMONCHUS CONTORTUS* POUR SA
RÉSISTANCE AUX PRODUITS ANTHELMINTHIQUES DE SYNTHÈSE ET SA
SENSIBILITÉ AUX TANINS CONDENSÉS**



Soutenu par Rachelle BERNIER

Septembre 2019

- ❖ Tutrice de stage: Docteure Carine MARIE-MAGDELEINE
- ❖ Co-encadrant : Docteur Javier ARECE-GARCIA
- ❖ Enseignant référent : Docteur Olivier GROS

Unité de Recherche Zootechnique de l'INRA

Domaine de Duclos Petit-Bourg, Guadeloupe

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur Harry OZIER-LAFONTAINE pour m'avoir donné son aval afin que je puisse réaliser ce stage au sein de l'institut National de Recherche Agronomique dont il a la présidence.

Je remercie également Madame Nathalie MANDONNET pour m'avoir accueillie au sein de son unité et de m'avoir permis de réaliser ce stage. J'ai relativement apprécié sa sympathie à mon égard.

C'est avec enthousiasme que je remercie ma tutrice Madame Carine MARIE-MAGDELEINE CHEVRY, pour sa prévenance, sa disponibilité, son soutien, son écoute, ses conseils judicieux, sa patience ainsi que son sourire ; autant de qualités humaines et de dispositions qui ont fortement contribué à mon intégration et mon épanouissement au sein de l'équipe. Carine, si je puis m'exprimer ainsi : pour ce que vous êtes, un grand MERCI !!!

Je remercie, d'autre part, Monsieur Lucien PHILIBERT pour sa générosité, sa bienveillance envers moi, ses conseils avisés, son assistance constante, et sa rigueur.

J'ai particulièrement apprécié les conseils pertinents et la joie de vivre contagieuse de Madame Suzitte CALIF.

Je remercie également Yohan FÉLICITÉ et Julien HIRA pour leur bonne humeur.

Mes remerciements s'adressent, par ailleurs, à Monsieur Mathieu BONNEAU pour les précieux conseils prodigués.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
Liste des ABREVIATIONS	3
I-INTRODUCTION	4
<i>Contexte général</i>	4
<i>Synthèse bibliographique</i>	5
a) Le parasite Haemonchus Contortus	5
b) Résistance d'HC aux principales familles d'AH de synthèse	6
c) Les tanins condensés	7
d) Evaluation in vitro des produits AH	9
II-Matériels et méthodes	10
A-Matériels	10
Matériel biologique	10
Matériel animal	10
Matériel végétal : Tanins condensés	10
Matériel chimique	11
B-Méthode	11
Extraction des tanins	11
Production des larves L3	11
TESTS ANTHELMINTIQUES IN VITRO	12
III-RESULTATS	17
Caractérisation de la résistance aux anthelminthiques de synthèse	17
Caractérisation de la sensibilité aux tanins condensés	19
Effet dose des tanins condensés	19
Effet sur la cinétique de dégainement de la larve L3.....	21
Relation structure-activité des tanins condensés sur les souches résistantes	23
IV-Discussion	25
V-Conclusion	28
Références bibliographiques	29
ABSTRACT:	31
RESUMÉ:	32

Liste des ABREVIATIONS

HC	<i>Haemonchus Contortus</i>
SGI	Strongles Gastro-Intestinaux
NGI	Nématodes Gastro-intestinaux
TC	Tanin Condensé
AH	Anthelminthique
LMIA	Larval Migration Inhibition Assay; FR : test d'inhibition de la migration Larvaire
LEIA	Larval Exsheatment Inhibition Assay; FR : test d'inhibition du dégainement Larvaire
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Proanthocyanidines
PD	Prodelphinidines
CE50	Concentration Efficace afin d'avoir le 50% d'effet
L1	Larves au stade L1
L2	Larves au stade L2
L3	Larves au stade L3
L4	Larves au stade L4
L5	Larves au stade L5
PTEA	Plate-forme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal
CRB	Centre de Ressources Biologiques
aa	Acide aminé
Phe	Acide aminé Phenylalanine
Tyr	Acide aminé Tyrosine
BZ	Benzimidazoles
LM	Lactones Macrocycliques
IVM	Ivermectine
MOX	Moxidectine
THIA	Thiabendazole
LEV	Lévamisole
DAA	Dérivés amino-acetonitrils

I-INTRODUCTION

Contexte général

L'élevage des petits ruminants est répandu dans la majeure partie des pays, avec 95% des caprins et plus de 75% des ovins élevés dans les pays tropicaux et subtropicaux (Mahieu,2014). Toutefois, chez les petits ruminants, les infestations par des nématodes parasites du tube digestif, autrement dit, les nématodes gastro-intestinaux (NGI) , comme le parasite *Haemonchus contortus* (100% de prévalence), sont une contrainte majeure pour l'élevage au pâturage, leur présence impactant de manière néfaste les performances (Marie-Magdeleine,2010).

Pendant plus de 50 ans, le mode principal de lutte contre les NGI a reposé sur l'emploi systématique et répété de traitements anthelminthiques (AH) de synthèse. Le but était d'éliminer les vers et d'interrompre ainsi leur cycle biologique et la dynamique des infestations (Hoste et al.,2018). Ce traitement était effectué sans évaluation préliminaire du risque parasitaire réel. Or les traitements administrés de manière systématique ont des conséquences nuisibles sur le développement de l'immunité de l'animal, l'environnement et le portefeuille de l'éleveur; et le risque d'émergence de résistances s'accroît. (Hoste ,Manolaraki,). De plus, au niveau santé publique, l'arsenal thérapeutique dirigé contre les parasites se réduit, surtout dans les élevages ovins/caprins et bovins laitiers, du fait de l'émergence des résistances aux AH chimiques. Par ailleurs, l'inquiétude des consommateurs quant à la présence éventuelle de résidus dans les produits alimentaires, ou encore des conséquences environnementales, n'a de cesse d'augmenter (Hoste et al.,2012).

Dans ce contexte, ce type de gestion du parasitisme en pâturage n'est pas une option durable. Par conséquent, la mise en place de solutions alternatives en substitution à la chimiothérapie et son caractère monolithique s'impose. Différentes stratégies sont mises en place afin d'optimiser l'utilisation d'anthelminthiques, comme la rotation des pâtures, l'utilisation de champignons et de bactéries nématophages (Sallé et al.2016), la résilience de l'hôte (sélection génétique, vaccination), ou encore la phytothérapie. L'utilisation de plantes contenant des tanins condensés (TC), constitue une alternative phytothérapique aux molécules anthelminthiques de synthèse. C'est dans ce cadre que se situent les travaux de lutte intégrée menés à l'INRA URZ.

L'objectif de cette présente étude, qui s'inscrit dans le cadre de la valorisation des métabolites secondaires des plantes tropicales en production animale. est d'évaluer les modes et mécanismes d'action des TC, via la caractérisation de la résistance du parasite modèle *H. contortus*, (HC) aux anthelminthiques de synthèse. Pour cela, il s'agit d'une part, de caractériser la résistance du nématode et d'autre part, d'évaluer l'effet des TC sur les souches résistantes du parasite au stade L3. Pour ce faire, de deux biotests sont mis en oeuvre : le test d'inhibition de la migration larvaire (LMIA) et le test d'inhibition du dégainement (LEIA).

Synthèse bibliographique

a) Le parasite Haemonchus Contortus

Haemonchus Contortus (le ver à pôle de Barber ou « BPW ») est un parasite très répandu, et l'un des nématodes les plus pathogènes des systèmes de production de petits ruminants dans les régions tropicales et subtropicales du monde. (Mahieu, 2014)

Depuis ses origines évolutives apparentes en Afrique subsaharienne, il est maintenant présent chez les petits ruminants dans presque toutes les régions du monde, et peut infecter une gamme de différents hôtes domestiques et animaux artiodactyles (Gilleard et Redman, 2016).

Aux Antilles, il fait partie des trois espèces de NGI qui parasitent les petits ruminants (Mahieu, 2014).

Il a une propension remarquablement élevée à développer une résistance aux médicaments anthelminthiques, rendant son contrôle de plus en plus difficile. Ce phénomène découle d'une combinaison de fécondité élevée et d'un court intervalle générationnel, qui fournit une plasticité de développement considérable pour l'adaptation ou la résistance aux mesures de contrôle (Gilleard et Redman, 2016)

Les vers adultes s'attachent à la muqueuse abomasale et se nourrissent de sang. Ce parasite est responsable de l'anémie, de l'œdème et de la mort des ovins et des caprins infestés (Emery et al., 2016)

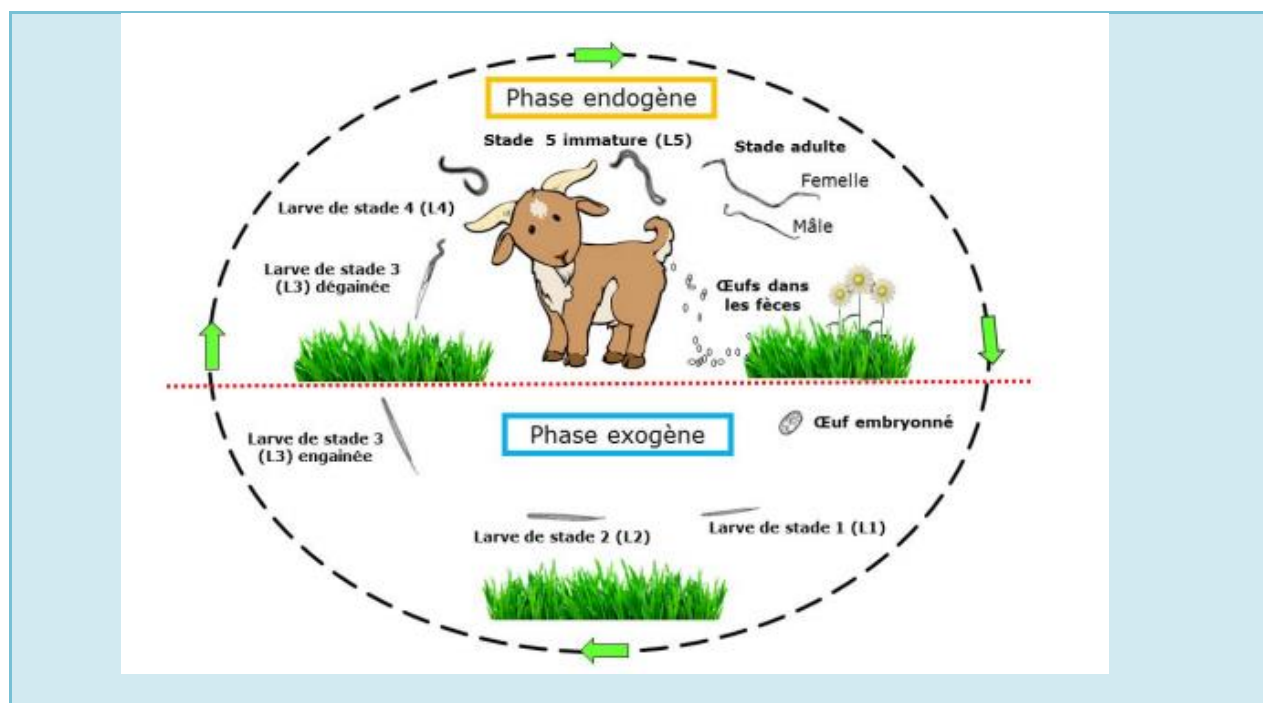


Figure 1. Cycle parasitaire du nématode *Haemonchus Contortus*

Source: thèse QUIJADA, 2015.

Les femelles situées dans la caillette de l'animal pondent quotidiennement 5000 à 10 000 œufs qui passent de l'animal hôte dans les fèces. Après dissémination et éclosion des œufs de HC, dans le

milieu environnant et dans des conditions optimales de températures (25 à 30°), des larves dites au stade L1 émergent. Les L1 évoluent au travers de deux mues successives pour devenir des larves L3.

La phase parasitaire commence par l'ingestion des L3 par l'hôte lors du pâturage (les L3 migrent vers le sommet des brins d'herbe et attendent d'être ingérées par les animaux). Dans le tube digestif, les L3 se libèrent d'abord de leur gaine (dégainement), ce qui marque la transition entre vie libre et vie parasitaire (De Rosa et al., 2005 ; Hertzberg et al., 2002).

Les L3 dégainées pénètrent ensuite dans la muqueuse digestive où elles muent en larves L4. Les L4 muent une dernière fois pour donner le stade 5, également appelé stade préadulte ou juvénile. Le passage au stade adulte correspond à l'acquisition de la maturité sexuelle. Après fécondation, les femelles pondent des oeufs excrétés dans les matières fécales de l'hôte (Urquhart et al., 1996).

b) Résistance d'HC aux principales familles d'AH de synthèse

Principales familles d'AH nématocides

Les nématocides actuels appartiennent à six groupes chimiques principaux :

Les benzimidazoles et probenzimidazoles, les dérivés de l'imidazothiazole, les dérivés de la pyrimidine, la pipérazine et ses sels, certains organophosphorés et enfin les avermectines et milbémycines. Ces deux derniers groupes sont appelés endectocides car leur activité inclut les parasites internes et externes. Mais, plus important encore que leur classification chimique, leur classification en fonction du mode d'action sur les parasites (C. Chartier et al., 2000). Ainsi sont distingués :

- Le groupe 1, qui est constitué de benzimidazoles et probenzimidazoles et se caractérise par leur liaison sur la tubuline du parasite.
 - Le groupe 2, qui rassemble le tétramisole, le lévamisole, le pyrantel et le morantel, molécules ayant l'habitude de se fixer sur les récepteurs postsynaptiques entraînant une paralysie.
 - Le groupe 3, qui est celui des endectocides (avermectines et milbémycines) qui ont pour propriétés de stimuler la libération de l'acide gamma-aminobutyrique, à l'origine du blocage de l'influx nerveux moteur.
 - Le groupe 4, qui est composé de nématocides à spectre étroit (actif vis-à-vis des vers hématophages tel que *H. contortus*) c'est-à-dire nitroxylnil, closantel, rafoxanide, qui agissent comme découplant de la phosphorylation oxydative, conduisant à l'épuisement énergétique.
- Il a été dressé le bilan suivant : HC présente actuellement une résistance à toutes les principales classes de médicaments anthelminthiques : les benzimidazoles (BZ), les imidazothiazoles et les lactones macrocycliques (LM) et même à la classe de dérivés de l'amino-acétonitrile (DAA), comme le monepantel, récemment introduite (Kotze et Prichard), et dont le mode d'action diffère des familles à large spectre connues, pré-citées (Kaminsky et al., 2008).

Résistance d'HC aux AH

En ce qui concerne les **BZ**, Kwa et al. (1994,1995) ont montré que la résistance de HC pour ces composés est basée sur la substitution d'un aa : Phe à la place de Tyr ce qui induirait une mutation du transcrit de l'isotype 1 de la tubuline b qui lui est sensible aux BZ. Ce polymorphisme nucléotique unique (SNP) est le principal déterminant de la résistance à la BZ chez *H. contortus* dans le monde. (Kotze et Prichard, 2016)

-Pour les **imidazothiazoles**, une étude de la résistance au lévamisole a démontré que la fixation du lévamisole sur le récepteur nicotinique à acétylcholine (nAChR) de HC concernait deux sites. Et dans le cas d'une résistance le récepteur avait une faible affinité pour le lévamisole donc était moins étroitement fixé (Sangster et Gill, 1999; Sangster et al., 1998b) (Kotze et Prichard, 2016).

Les **LM**: Il a été reporté, lors d'une étude sur des isolats de HC résistants à l'IVM et à la MOX, qu'une mutation du gène codant pour les canaux ioniques chlorure glutamate (GluCl) de sous-unité alpha était associée à la résistance. (Blackhall et al., 1998). De plus,

Pour les **DAA**: L'équipe de Kaminsky (2008) a trouvé que les lignées résistantes de HC présentaient des mutations chez deux gènes de sous-unités nAChR: Hco-des-2H et Hco-acr-23H (ultérieurement renommé Hco-mptl-1). Un panel de mutations, de perte de fonction a été identifié dans le gène Hco-mptl-1 dans les lignées mutantes. Ces différentes mutations incluaient des délétions, menant à un mauvais épissage, ainsi que des insertions et des mutations ponctuelles menant à la terminaison prématurée de la traduction de la protéine.

c) Les tanins condensés

La phytothérapie, en particulier avec des extraits de plantes riches en métabolites secondaires notamment en tanins condensés, a été proposée comme une alternative durable pour le contrôle des NGI. En effet, peu de résistances sont observées avec les molécules naturelles (complexité moléculaire), par rapport aux molécules de synthèse dont il est fait l'usage intensif. (MARIE-MAGDELEINE-CHEVRY, 2010).

Définition, structure des TC

Les tanins condensés sont des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 kDa. Ils sont considérés comme des métabolites secondaires des végétaux supérieurs (Salminen et al., 2011). La structure des composés phénoliques comprend au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements phénoliques. La grande famille des polyphénols s'étend des molécules simples, comme les acides phénoliques, aux molécules hautement polymérisées, comme les tanins. Il est usuel de distinguer deux groupes de tanins selon leur structure biochimique: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Mueller-Harvey, 2006 ; Salminen et al., 2011).

Les tanins hydrolysables (THs) sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (Salminen et al., 2011).

Les tanins condensés (TCs), ou proanthocyanidols (PAs), sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes (Mueller-Harvey, 2006). Ce sont des oligomères ou polymères des flavan-3-ols, dont la structure chimique des flavonoïdes est basée sur un système d'hétérocycles (Figure 3). En général, les TCs ont des poids moléculaires plus élevés que ceux des THs (Mueller-Harvey, 2006).

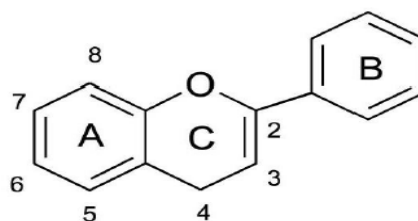


Figure 2: Structure du flavonoïde (*source : thèse QUIJADA*)

L'unité de base (ou monomère) des TC est un flavan-3-ol (Figure 3). Les TC sont des polymères de flavan-3-ols liés par des liaisons de type C-C (Type B) ou C-OC (type A)(Mueller-Harvey, 2006). Selon la nomenclature française, les noms des TC se terminent en «-ols» car ce sont des flavonoïdes (nomenclature anglaise : terminaison en «-in»).

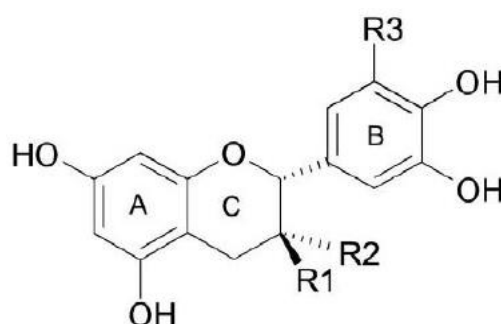


Figure 3: Structure des flavan-3-ols (*source : thèse QUIJADA*)

En fonction du degré de polymérisation (nombre de flavan-3-ols composant le TC), on distingue généralement les oligomères, comprenant de 2 à 10 monomères, des polymères contenant plus de 10 monomères (Mueller-Harvey, 2006).

Bio-activité anthelminthique des TC

Des multiples études *in vitro* ont été réalisées afin d'évaluer l'efficacité d'extraits de plantes riches en tanins, ainsi que pour incriminer le rôle des TC dans les effets AH observés. (Quijada, 2015). Les études les plus récentes ont été focalisées sur l'évaluation des fractions purifiées de tanins, afin de comprendre les interactions entre les diverses structures moléculaires des TC et les effets AH (Naumann et al., 2014 ; Novobilský et al., 2013 ; Williams et al., 2014). Pour les différents tests réalisés, le degré d'inhibition paraissait varier en fonction de la structure chimique des monomères puisque les plus fortes inhibitions ont été observées pour les monomères des PD et les gallates. Mais aussi en fonction de la concentration en flavan-3-ols. (Molan et al., 2003 ; Molan et al., 2004).

En bilan, ces études *in vitro* ont démontré l'effet AH des plantes riches en TC sur les trois principales espèces de NGI *H. contortus*, *T. circumcincta*, et *T. colubriformis*, majoritairement trouvées chez les petits ruminants. Par ailleurs, des variations d'effets ont été décrites en fonction de la plante-source de TC, et du stade parasite. La maturité, l'organe, l'espèce de la plante, la nature du sol, le climat sont autant de facteurs qui influencent la concentration en substance active. (MARIE-MAGDELEINE-CHEVRY, 2010).

Leur capacité à se lier aux protéines (Hoste et al., 2012) confèrent aux TC leur caractère nématocide. Ainsi, les TC agissent en inhibant les enzymes clés du parasite, et l'inhibition des glutathion-S-transférases, qui jouent un rôle important dans la détoxification des composés xénobiotiques, a été confirmée par des expériences *in vitro* sur *Ascaris suum* (Hansen et al., 2016). Les PD ont plus de groupes phénoliques capables de former des liaisons hydrogène avec les protéines que les PC, mais il a également été établi que la valeur du degré de polymérisation (mDP) est le facteur le plus important pour l'agrégation et la précipitation des protéines CT (Zeller et al., 2015b; Ropiak et al., 2017). Prises ensemble, ces observations pourraient expliquer pourquoi les PD, qui ont généralement des valeurs de mDP plus élevées que les PC, ont de meilleures propriétés anthelminthiques (Hoste et al., 2016; Kommuru et al., 2014, 2015).(Mueller et al.,2019).

d) Evaluation in vitro des produits AH

Les principales méthodes utilisées *in vitro* pour évaluer l'activité AH contre les nématodes chez les ruminants sont les suivantes :

- ✚ Le test AMIA (Adult Motility Inhibition Assay): méthode d'inhibition de la motilité qui ciblent les vers adultes
- ✚ Le test LEIA (Larval Exsheatment Inhibition Assay): méthode d'inhibition du dégainement larvaire cible le stade L3
- ✚ Le test LMIA (Larval Migration Inhibition Assay): méthode d'inhibition de la migration larvaire cible aussi le stade L3
- ✚ Le test EHA (Egg Hatch Assay) cible les stades œufs
- ✚ Le test LDIA (Larval Development Inhibition Assay): méthode d'inhibition du développement larvaire cible les stades L1,L2,L3.
- ✚ Le test LFIA (Larval Feeding Inhibition Assay): méthode d'inhibition de nutrition des L1.

Des essais préliminaires menés au laboratoire de l'URZ (Lambourde,2017) ont montré que le test LMIA était le plus adapté à la caractérisation de la résistance d'HC aux IVM, LEV,MOX et THIA. De plus ce test est facilement reproductible,rapide et il permet une appréciation qualitative et quantitative (Kotze etPrichard,2016). Ce test sera donc choisi pour l'évaluation de la résistance des souches aux AH de synthèse.D'autre part, le LEIA est un test largement utilisé pour sélectionner l'activité AH soit des extraits de plantes, des fractions de tanin ou des monomères de flavan-3-ol (Molan et al.,2004 ; Novobilský et al.,2013 ; Quijada et al.,2015). Il présente des avantages certains quant à sa simplicité et sa reproductibilité, il est donc adapté au screening. En outre, les résultats obtenus pour ce test sont souvent retrouvés *in vivo*. De surcroît, le choix de ces deux tests permet de travailler sur le même stade larvaire L3, clef du processus de développement du parasite HC.

II-Matériels et méthodes

A-Matériels

Matériel biologique

Cinq souches (B, C, G et J) du parasite *H. contortus* au stade L3, provenant de quatre exploitations agricoles de Guadeloupe, basées sur les zones Grande-Terre (souches B, R et G) et Basse-Terre (souche J et C), sont caractérisées pour leur résistance et leur sensibilité aux anthelminthiques de synthèse et aux tanins condensés, via des essais *in vitro*.

Pour permettre la réalisation des différents tests *in vitro*, ces 5 souches, conservées en azote liquide à -196°C dans de l'azote au centre de Ressources Biologiques (CRB CARARE) de l'INRA, seront au préalable multipliées.

Matériel animal

Afin de multiplier les souches de nématodes, 10 cabris naïfs âgés de 4,5 mois sont infestés expérimentalement par les 5 souches d'*H. contortus* pré-citées, au sein de l'unité expérimentale INRA PTEA, sur le site de Gardel au Moule (Guadeloupe).

Matériel végétal : Tanins condensés

Huit espèces végétales tropicales riches en tanins condensés (TC) et appartenant à six familles botaniques différentes ont été sélectionnées pour une variabilité de composition et de nature de tanins condensés, préalablement déterminées (Tableau 1). Les extraits de TC issus de ces 8 plantes (TC1 à TC8) sont conditionnés et conservés au -80°C du laboratoire de l'URZ, dans l'attente des analyses et essais expérimentaux.

Tableau 1. Paramètres de composition chimique déterminés dans les 8 extraits de tanins condensés évalués.

Paramètre	Intervalle de teneur	Valeur médiane
Flavanols libres	0.15 – 6.21	1.21
PD libres	0.15 – 6.18	0.85
TC	9 - 72	43.02
mDP TC	4.58 – 9.19	6.85
PD TC	5.26 -99.19	57.36
Trans	2.86 - 43.90	29.68
Groupe galloyls TC	0 -73.49	40.23

TC : tannins condensés ; PD : prodelphinidines ; mDP : Degré de polymérisation moyen ; trans : stéréochimie trans des TC.

Matériel chimique

Anthelminthiques de synthèse utilisés pour le test LMI sont les suivants :

AH de synthèse	Moxidectin vetranal, analytical standard	2-(4-Thiazolyl) benzimidazole	levamisole hydrochloride	22,23-Dihydroavermectin
Nom commercial	Moxidectine	Thiabendazole	Levamisole	Ivermectine
Marque	Sigma-aldrich	Sigma-aldrich	Applichem USA Panreac	Sigma-aldrich
Pureté	≥ 95%	≥ 99%		≥ 90%
Origine	Saint-Louis, Missouri USA	Saint-Louis, Missouri USA	Saint-Louis, Missouri USA	Saint-Louis, Missouri USA

B-Méthode

Extraction des tanins

Les TC ont été extraits à partir des feuilles matures des plantes qui ont été préalablement séchées à l'étuve ventilée à 40°C pendant 48 à 72h et sont ensuite réduites en poudre dans un broyeur au laboratoire de l'URZ. La poudre de feuilles ainsi obtenue est traitée à l'acétone 70% dans de l'acide ascorbique, et l'extrait obtenu est ensuite délipidé à l'éther diéthylique. L'éther évaporé, les tanins contenus dans l'extrait sont ensuite purifiés avec de l'éthanol en utilisant un gel d'exclusion de sephadex LH20, qui permet de récupérer les tanins condensés par lavage à l'acétone.

Production des larves L3

Les animaux, placés en cage individuelle à digestibilité, sont nourris exclusivement au **foin** durant l'expérience. Les caprins ont été traités préalablement à l'Oramec (ivermectine), au Cestocur (anti cestodes) et Polystrongles (lévamisole) afin d'éliminer tout parasite de l'organisme, et ainsi limiter tout biais lié à l'infestation lors du démarrage des expérimentations. Après vérification de l'absence d'œufs dans les fèces, les animaux ont été infestés per os avec 5000 L3 d'HC de chacune des 4 souches :

- B administrée à trois animaux
- C administrée à deux animaux
- R administrée à deux animaux
- G administrée à trois animaux.

Ces souches issues du CRB CARARE ont été décongelées à 37°C avant vérification et préparation pour l'infestation.

La souche J, souche de travail utilisée en routine, est disponible en quantités suffisantes pour les essais.

Les fèces ont été recueillies 25 jours post-infestation et mis en culture automatiquement après récolte, pendant huit jours à température ambiante, en s'assurant d'une bonne humidité de la coproculture. Après coproculture, les larves au stade L3 sont extraites de la matière fécale par le dispositif de BAERMANN (voir annexe..) qui repose sur l'hygrotropisme de ces dernières. S'en succède l'étape de comptage et de concentrations des larves pour les biotests *in vitro* au laboratoire.

TESTS ANTHELMENTIQUES IN VITRO

1-Test d'inhibition de la migration larvaire par les produits anthelminthiques de synthèse (Larval Migration Inhibition Assay, LMIA)

a) Objectif et principe

L'objectif du test LMIA est de mesurer l'effet des produits AH sur le potentiel de migration des larves L3. Le test appliqué repose sur la mesure du taux de migration des larves L3 à travers une membrane après contact avec les produits à tester. Le pourcentage de larves ayant traversé la membrane permet de calculer l'inhibition de la migration larvaire au produit testé.

Une quantité connue de larves L3 (1000 L3/ml) est mise en contact pendant 3h à température ambiante avec chaque produit anthelminthique (AH) à tester, à la concentration de 1% à raison de 5 répétitions par AH.

Un témoin négatif (tampon PBS, pH 7,4 ; 0,01M) permet d'évaluer la migration des larves en absence d'AH. Les larves L3 sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS et centrifugées, puis laissées en migration à travers des mailles de 20 µm pendant 3 heures à température ambiante.

Les larves ayant migré sont reprises dans un volume de 1040µL. Le nombre de larves est alors compté dans 200µL.

b) Réactifs

*Solution PBS (Phosphate Buffer Saline) reconstituée qsp 1L, 0,01 M, pH=7,4 à 25°C

*Solution de moxidectine à 1% en PBS

*Solution de lévamisole à 1% en PBS

*Solution d'ivermectine à 1% en PBS

*Solution de thiabendazole à 1% en PBS

c) Matériels

-Béchers	-Agitateur magnétique IKA® C-MAG HS7
-Pipette graduée	-Barreau aimantés (petits calibres)
-Poire à pipeter	-Microscope photonique (Leica/Leitz)
-Pipette pasteur	-Tamis d'une porosité de 20µm fixé à l'insert
-Micropipette (P200,P1000)	-Centrifugeuse Thermo scientifique ST40 R
-Pince	-Inserts 5mL
-Plaquette de lecture (comptage)	-2 portoirs en polypropylène
-Vortex	-Fiole jaugée (1000 mL)
-Tubes falcons de 15 mL	

d) Mode opératoire

Préparation de la solution larvaire

Préalablement au test, la concentration de larves présentes dans la solution larvaire obtenue par la méthode de Baermann a été déterminée. Les larves, mises à température ambiante, sont dénombrées au microscope, par séries de 10 gouttes de 20µL déposées sur plaque de lecture. La concentration est calculée en reportant le comptage, au volume de 1mL. Les concentrations obtenues pour chaque souche sont les suivantes :

Souche	concentration
G	720L3/mL
R	1050L3/mL
B	860L3/mL
C	930L3/mL
J	1110L3/mL

Après quoi est calculé le volume Y à prélever dans chaque suspension pour distribuer 1000 larves dans chaque tube:

Y (souche 1 G) = 1,2 mL/ Y (souche 2 R) = 0,95 mL/ Y (souche 3 B) = 1,2 mL/ Y(souche 4 C) = 1,1 mL

Mise en contact et lancement du test

Les différentes suspensions larvaires sont mises en contact avec chacun des produits AH chimiques à tester. Pour chaque souche, dans des tubes falcons coniques de 15 mL identifiés et disposés dans les portoirs, ont été ajoutés 1 mL de solution larvaire et 1 mL d'AH, puis agités au vortex. Cinq répétitions sont réalisées pour chaque produit testé. Le PBS seul est utilisé comme témoin négatif à raison de 5 répétitions également. Une incubation d'une durée de 3H est ensuite réalisée à température ambiante (25°C). Suite à l'incubation, trois rinçages successifs sont réalisés : les tubes sont centrifugés à 4500 rpm pendant 5 min à 15°C, le surnageant ne contenant pas de larves est prélevé et 2 mL de PBS sont ajoutés puis une nouvelle centrifugation est effectuée. Après 3 centrifugations, le dernier culot est repris dans 1 ml de PBS. Pour chacun des tubes, les larves remises en suspension sont agitées au vortex avant d'être prélevées puis posées délicatement en migration dans un autre tube contenant du PBS et équipé d'un insert d'une porosité de 20µm posé au ras du liquide. Après 3h d'incubation à température ambiante dans un portoir, le contenu de l'insert est prélevé des tubes. Le volume de l'ensemble des tubes est ajusté à 2 mL avec du PBS. Pour chaque tube, un échantillon de 10 gouttes de 20µl est prélevé après homogénéisation et observé au microscope photonique afin de prédéterminer le nombre de larves ayant migrées activement.

Calculs

Une fois le nombre de larves déterminé dans chaque goutte, le pourcentage brut de larves (L3) ayant migrées ainsi que le pourcentage de migration par rapport au témoin négatif (PBS) est calculé selon la formule :

$$\% \text{ de migration} = \frac{B_{\text{plante}}}{B_{\text{témoin}}} \times 100 \quad \text{avec } B = \frac{Z \times X \times T \times 100}{N}$$

B : Pourcentage brut de L3 ayant migré

N : Nombre de larves mises en contact avec les extraits

Z : Nombre de larves comptées c'est à dire larves ayant effectivement migré

X : Facteur multiplicatif pour exprimer le nombre de larves comptées par ml

T : Volume d'ajustement dans les tubes coniques

2-Test d'inhibition du Dégainement larvaire par les tanins condensés (Larval Exsheatment Inhibition Assay, LEIA)

a) Objectif et principe

Le test de dégainement a pour objectif de tester l'efficacité des TC sur l'inhibition du dégainement des larves L3 de HC.

Les larves L3 ont été récupérées par coproculture. Suite au test LMIA, les 3 souches les plus spécifiques G, C et J, ont été choisies pour la poursuite des essais avec les TC.

Le test consiste en la mise dégainement artificiel des larves L3, suite à une exposition aux TC. L'effet positif des TC sur le dégainement sera mis en évidence par une inhibition de ce dernier.

b) Réactifs

- Solution tampon PBS (phosphate buffer saline) reconstituée qsp 1L, 0.01M, Ph=7,4, 25°C
- NaCl à 16.6%
- Eau de javel à 2.6% de Chlore Actif (solution commerciale)
- Huit extraits de TC identifiés comme suit : TC1 ;TC2 ;TC3 ;TC4 ;TC5 ;TC6 ;TC7 ;TC8
- Lugol

c) Matériels

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">-Béchers-Pipettes automatiques (P20,P200,P1000)-Tubes falcons (15 mL, 50 mL)-Tubes eppendorfs (2 mL)-Tubes cristal (5 mL)-Fioles jaugées (100 mL, 1000 mL)-Pipettes graduées (5 mL,10 mL,25 mL)-Barreaux aimantés (petits calibres)-Poire à pipeter- Balance AG204 Mettler Toledo haute précision (0,1 mg) | <ul style="list-style-type: none">- Agitateur magnétique IKA® C-MAG HS7- Agitateur IKA-VIBRAX-VXR pour le maintien de l'agitation constante des tubes (rotation dans le plan de la paillasse sur 360°)-Plaquette quadrillée (comptages)-Microscope photonique (Leica/Leitz)-Centrifugeuse Thermo scientifique ST40 R-Chronomètre lab box-Portoirs (tubes cristal, tubes eppendorfs) |
|---|---|

Mise au point du test de dégainement

Cette étape aura pour finalité de préciser la concentration de solution hypochlorite la plus adéquate à utiliser pour le test. La concentration de solution hypochlorite devra provoquer le dégainement de la totalité des larves (100%) à T70 minutes-T80 minutes. Cette mise au point sera reconduite pour les trois souches de HC sélectionnées.

Le volume des solutions larvaires a été ajusté à l'eau distillée afin que l'intégralité des tests puisse être réalisée. Les concentrations et volumes suivants ont donc été obtenus :

Souche C (V= 130 mL)	[c] = 700 L3/mL
Souche G (V= 177 mL)	[c] = 550 L3/mL
Souche J (V= 225 mL)	[c] = 840 L3/mL

Les solutions larvaires ont été soumises au processus artificiel de dégainement par mise en contact avec une solution de NaCl 16,6% et d'eau de Javel à 2,6 % de Chlore Actif dilué aux concentrations 1/100, 1/150. Pour ce faire, ont été distribués 1000 µL de chaque solution larvaire dans des tubes cristal distincts bien identifiés, et 1000 µL de la dilution hypochlorite sous agitation. Des tubes témoins pour chaque souche ont aussi été réalisés avec du PBS en substitution à la solution hypochlorite.

Toutes les 10 min durant 80 min, 200 µL de chaque tube ont été prélevés et transférés dans des tubes eppendorfs, dans lesquels 20 µL de lugol concentré auront été préalablement distribués.

Test de dégainement

Les larves L3 gainés ont d'abord été incubées pendant 3 h à température ambiante avec chacun des TC aux concentrations de 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0,05 mg/ml dans une solution tampon phosphate (PBS 0,01 M, NaCl 0,05 M).

L'utilisation de PBS visant à éviter les interférences avec un effet non spécifique dû au changement de pH. De plus, le PBS est également utilisé comme témoin positif. Le recours à un témoin PBS pour chaque souche à chaque test est la condition sine qua non de validation du test.

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 à 2,6 % de Chlore Actif dilué à la concentration définie lors de la mise au point. La cinétique de dégainement est mesurée sous observation microscopique, en prélevant 200 µl à T40 minutes, T70 minutes et T80 minutes de chaque tube qui seront déposés dans un tube eppendorf de 2 mL.

Pour chaque dose d'un même tanin condensé, et chaque témoin PBS, trois répétitions ont été exécutées

Calculs

Une lecture et un comptage du nombre de larves gainées et dégainées est réalisée afin de saisir les données sur un tableur Excel. Puis le pourcentage de larves dégainées par rapport aux larves gainées est calculé selon la formule :

$$\% \text{de larves dégainées} = \frac{\text{Nombre de larves dégainées}}{\Sigma \text{nombre de larves gainées} + \text{nombre de larves dégainées}} * 100$$

Analyse statistique des données

Les données obtenues pour les deux tests in vitro ont été soumises à une analyse de variance par le logiciel Minitab version 16. Les moyennes obtenues sont comparées deux à deux afin d'évaluer les effets souche, produit, et les interactions entre les facteurs : souche, produit, , temps, dose, selon le test.

De plus, lorsqu'un effet dose est mis en évidence, la concentration efficace pour inhiber 50% du dégainement (CE50), est déterminée à 80 min, en réalisant une régression probit via le logiciel SAS version 9.4.

D'autre part, afin d'évaluer les relations entre activité et résistance des souches, et structure/composition des TC, un calcul des corrélations de Pearson est réalisé à l'aide du logiciel Minitab version 16.

La P value du test statistique permettant de comparer les moyennes est fixée à 95% pour conclure à l'équivalence des moyennes. Quand la P value est inférieure à 5% une différence significative entre les moyennes comparées est établie. De même pour les corrélations.

Par ailleurs, dans le but de caractériser les TC, une analyse en composantes principales a aussi été effectuée via le logiciel statistique SPSS (version 22,0 pour windows).

III-RESULTATS

Caractérisation de la résistance aux anthelminthiques de synthèse

Les résultats de l'effet des produits anthelminthiques de synthèse sur la migration larvaire sont synthétisés dans le tableau 1 et la figure 1 ci-après. Les souches sont qualifiées de la manière suivante pour leur résistance au produit testé, selon la valeur du taux de migration larvaire :

- Sensibles : de 0 et 10% de migration larvaire.
- Faiblement résistante : de 10 à 30% de migration larvaire.
- Moyennement résistante : de 30 à 50% de migration larvaire.
- Fortement résistante : plus de 50% de migration larvaire.

Pour les différentes souches de parasites testées, le témoin PBS a montré un pourcentage de migration moyen de 36.7% (min 24.23% ; max 52.32%). Ce résultat est significativement différent des valeurs obtenues pour les différents anthelminthiques de synthèse testés ($P < 0.05$).

Les résultats, rapportés au témoin PBS (tableau 1), montrent que, mis à part le levamisole (LEV) et l'ivermectine (IVM) ($P = 0.999$), tous les produits ont des effets sur la migration larvaire, significativement différents entre eux ($P < 0.05$).

Les souches d'*H. contortus* sont surtout sensibles à l'IVM et au LEV, et sans différences significatives (tableau 1). De plus, elles sont moyennement résistantes à la moxidectine (MOX) et fortement résistantes au thiabendazole (THIA). **La souche G est la plus sensible aux produits testés, et la souche C, est la plus résistante.**

Produit	% migration
Thiabendazole	57.6 ^a
Moxidectine	33.4 ^b
Levamisole	8.5 ^c
Ivermectine	8.1 ^c
Souches	
B	18.0 ^{cd}
C	47.9 ^a
G	11.1 ^d
J	33.6 ^b
R	24.1 ^{bc}

Tableau 2 : Effet des produits anthelminthiques de synthèse, sur la migration larvaire d'*H. contortus* au stade L3.

a, b, c : Les moyennes ne partageant aucune lettre sont sensiblement différentes.

La souche C, est **multirésistante** à IVM, LEV MOX et THIA, avec une résistance forte pour le THIA et moyenne pour la MOX. Les souches G, J, B et R sont significativement **sensibles** à IVM et LEV, et toutes plus ou moins résistantes à MOX et THIA, avec une résistance à THIA significativement forte pour la souche J, et moyenne pour la souche R. Les souches B et R sont moyennement résistantes à MOX (Figure 4).

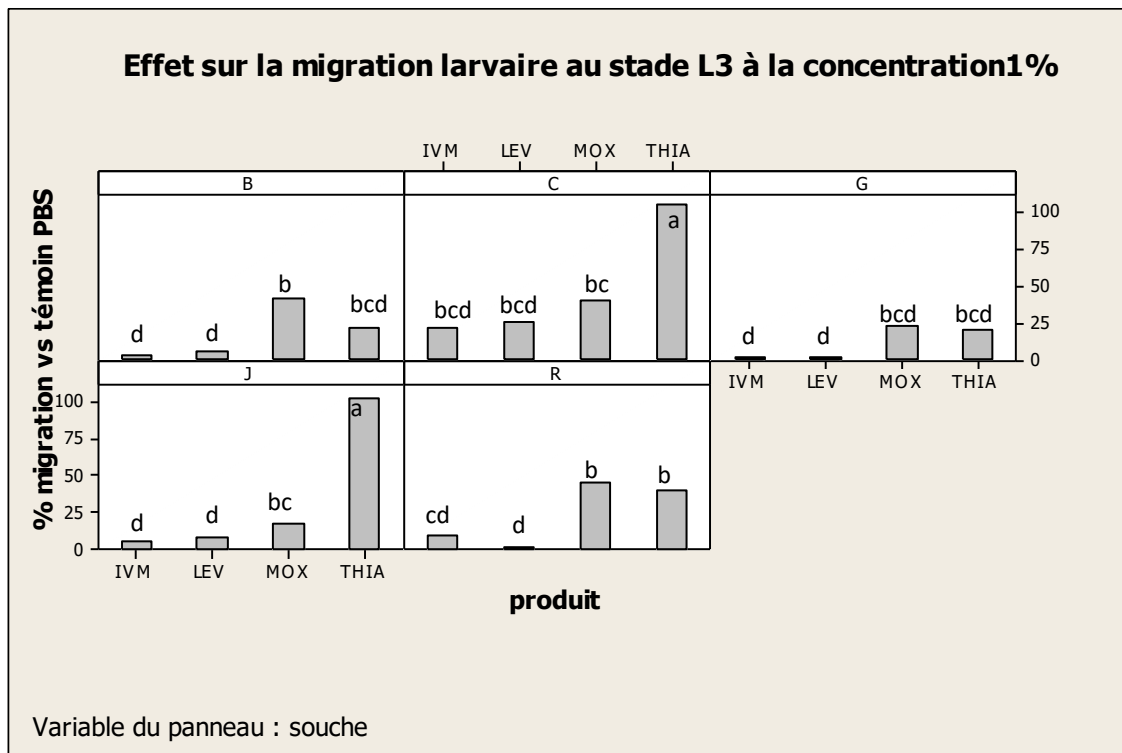


Figure 4. Effet des produits anthelminthiques de synthèse, sur la migration de différentes souches du parasite *H. contortus* au stade L3.

Caractérisation de la sensibilité aux tanins condensés

Les résultats sont illustrés sur les figures 5 à 9 et le tableau 2, ci-après. En raison de problèmes techniques, le TC 7 n'a pas été évalué sur la souche G et les effets doses n'ont pu être mesurés que pour les souches C et J. Les résultats sont présentés sur le tableau 2 et les figures 5 à 11.

Effet dose des tanins condensés

Globalement, au bout de 80min, le témoin PBS a montré un pourcentage de dégainement compris entre 83 et 98% pour l'ensemble des souches. Les TC ont montré des effets variables, compris entre 9 et 100% (figure 5). Les 3 souches sont significativement sensibles aux TC4 et TC7, et faiblement résistantes au TC2, sans différences significatives (figure 5). Aucune différence significative n'est observée pour la souche G, entre les forts effets significatifs des TC 1, 4, 5 et 6 (>85%). Tandis qu'un effet moyen (62.73%) significativement différent est observé pour le TC3 sur cette même souche. Les TC 3, 5, 6 et 8 ne montrent aucun effet significatif sur la souche C, comparativement au témoin PBS. Les TC 2, 5, 6 et 8 montrent des effets assez forts (66 à 74%) et non significativement différents sur la souche J. Les TC 1 et 3 montrent de plus faibles effets, significativement différents, respectivement 38.77% et 33.74% sur les souches C et J (figures 5, 6 et 7).

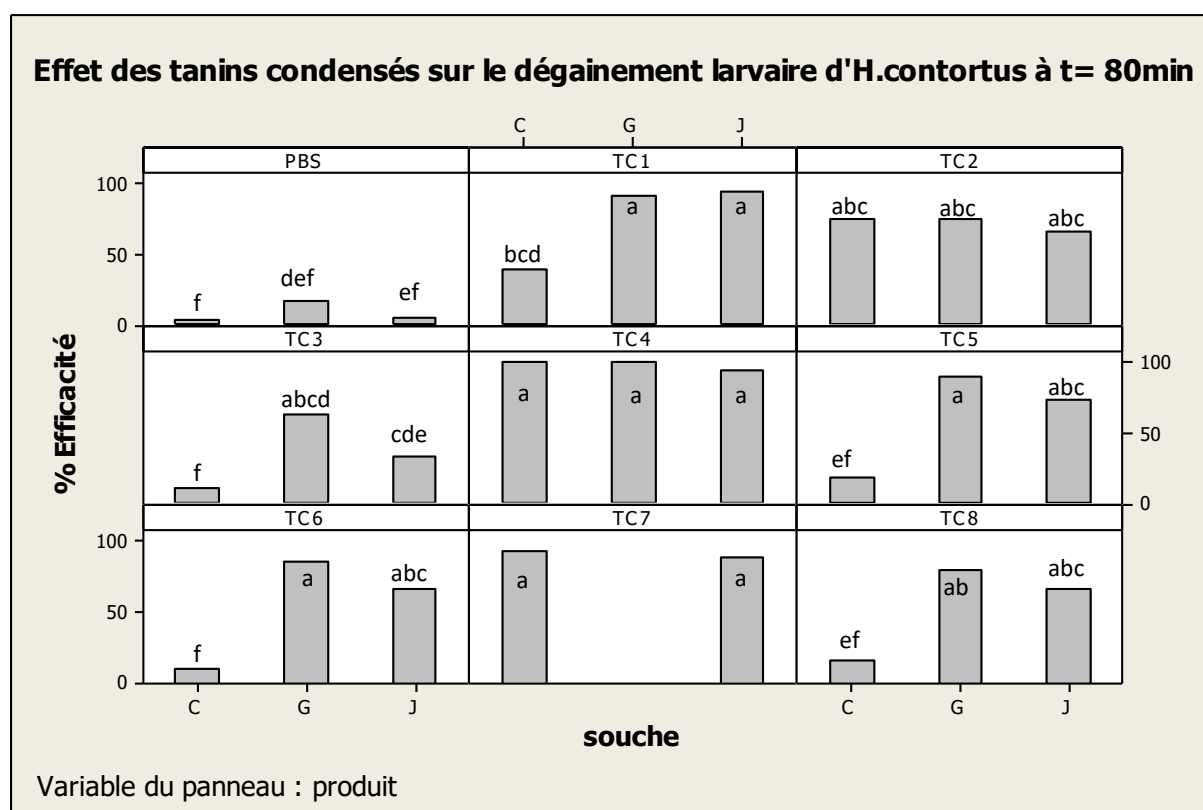


Figure 5. Effet des tanins condensés (TC), toutes doses confondues, sur le dégainement des larves L3 de 3 souches (C, J G) du parasite *H. contortus*

Le TC 4 n'a pas montré d'effet dose, et les TC 3, 5, 6 et 8 n'ont pas montré d'effet significatif aux concentrations évaluées sur la souche C. Tous les TC ont montré un effet dose sur la souche J (figures 5 et 8). Les TC montrent des EC50 comprises entre 1.36×10^{-6} et 1 mg/ml. Les TC1 et 7 sont les plus efficaces sur le dégagement larvaire respectivement des souches J et C, avec des valeurs inférieures pour la souche J. Les TC2 et 3 sont les moins efficaces, respectivement sur les souches C et J, avec une valeur inférieure de le CE50 du TC2 pour la souche C (Tableau 2).

	CE50 (mg/ml)	
	Souche C	Souche J
TC1	0.05616	1.36E-6 (1.54E-24 ; 2.494E-4)
TC2	0.099 (0.187 ; 0.255)	0.214 (0.171 ; 0.258)
TC3	-	0.949 (0.880 ; 1.017)
TC4	-	2.55E-6 (2.5068E-46 ; 6.462E-4)
TC5	-	0.151 (0.127 ; 0.177)
TC6	-	0.419 (0.385-0.454)
TC7	0.03992	1.41E-3(1.72E-5 ; 8.4E-3)
TC8	-	0.222 (0.193 ; 0.252)

Tableau 3: Concentration Efficace 50 (CE50) des tanins condensés (TC), sur le dégagement larvaire des souches C et J du parasite *H. contortus*.

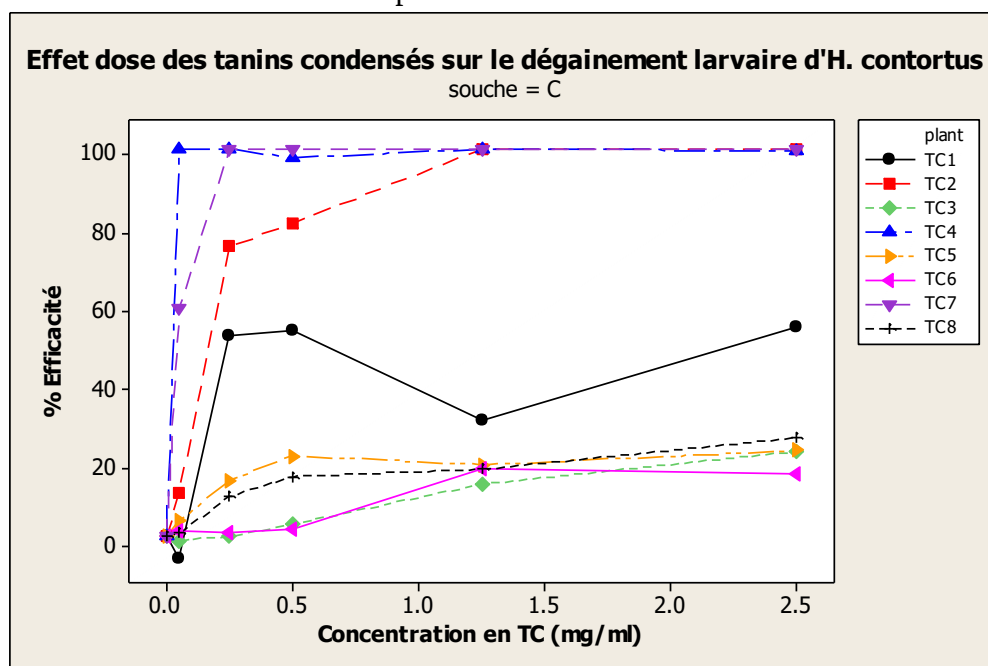


Figure 6. Effet-dose des TC sur le dégagement larvaire du parasite *H. contortus* au stade L3 de la souche C.

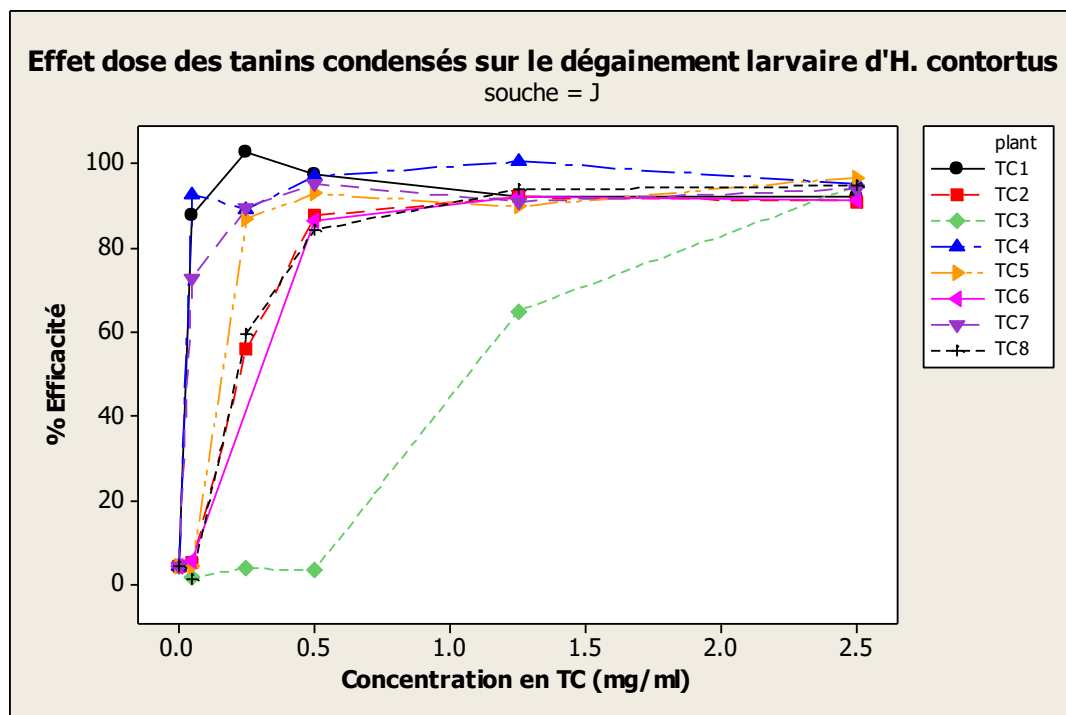


Figure 7. Effet-dose des tanins condensés (TC) sur le dégainement larvaire du parasite *H. contortus* au stade L3 de la souche J.

Effet sur la cinétique de dégainement de la larve L3

Globalement, les vitesses de dégainement des souches testées suite à la mise en contact avec les différents TC à la concentration de 2.5 mg/ml (figures 5, 6, 7 et 8), sont non significativement différentes pour les souches J et G. Cependant, il est observé une différence significative pour la souche C, avec une inhibition plus rapide du dégainement avec les TC 1, 2, 4 et 7, et plus lente avec les TC 3, 5, 6 et 8. Le TC1 étant intermédiaire (figures 8 et 9).

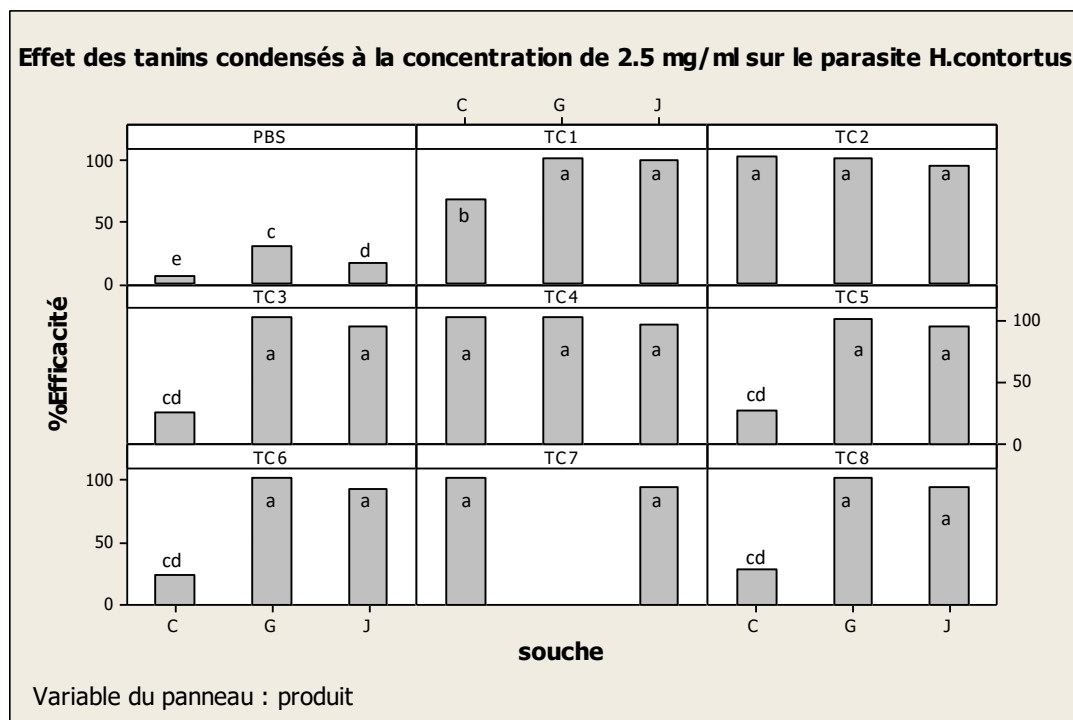


Figure 8. Effet des tanins condensés à la concentration de 2.5 mg/ml, sur la cinétique de dégagement de différentes souches du parasite *H. contortus*.

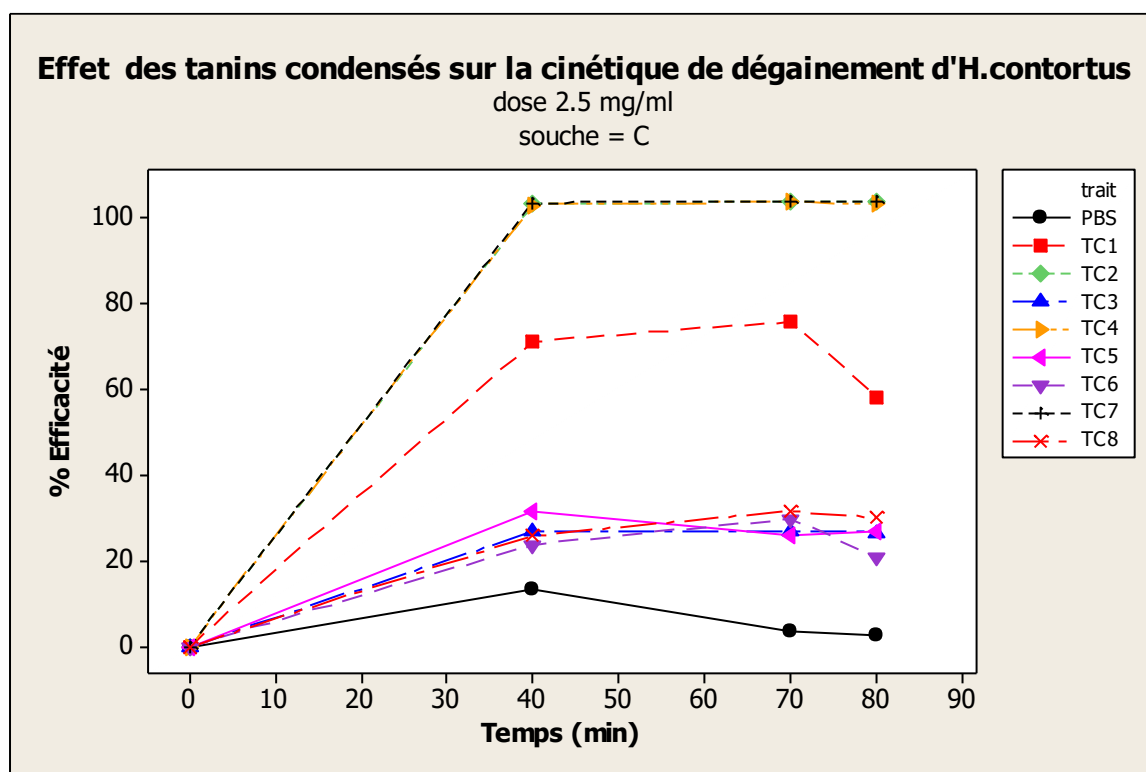


Figure 9. Effet des tanins condensés à la concentration de 2.5 mg/ml, sur la cinétique de dégagement de la souche *H. contortus* C

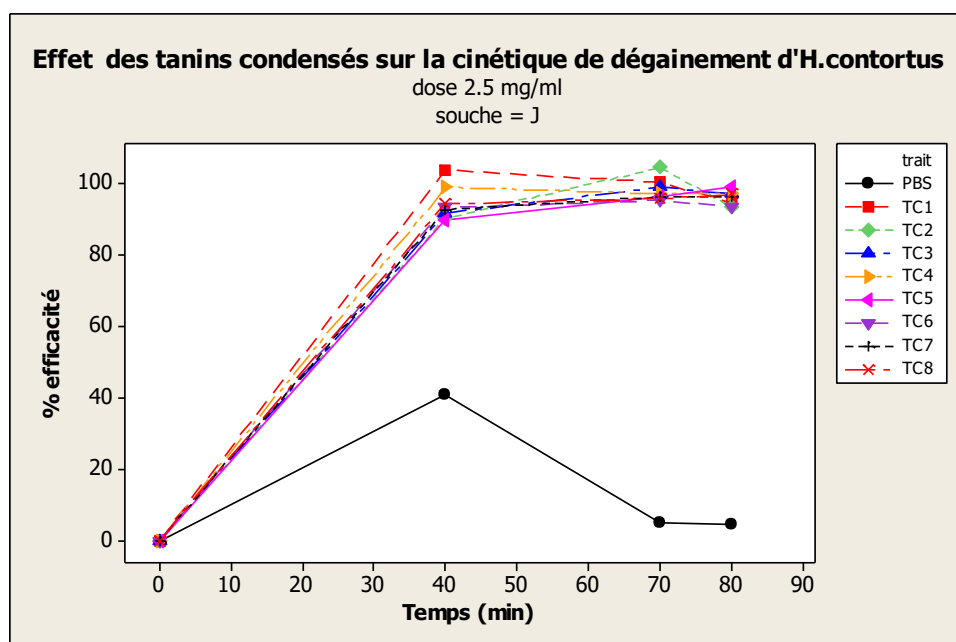


Figure 10. Effet des tanins condensés à la concentration de 2.5 mg/ml, sur la cinétique de dégainement de la souche *H. contortus* J.

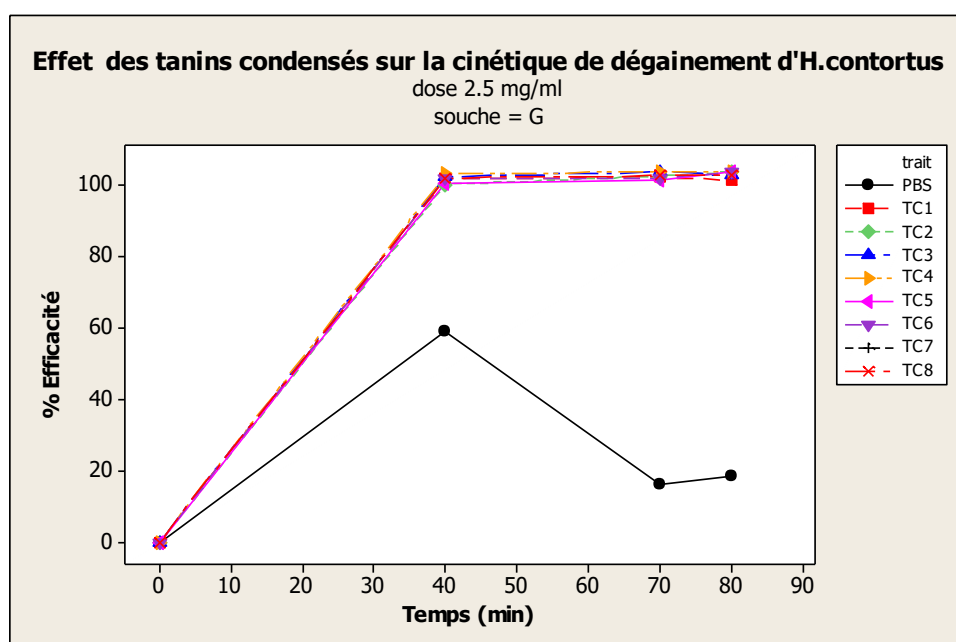


Figure 11. Effet des tanins condensés à la concentration de 2.5 mg/ml, sur la cinétique de dégainement de la souche *H. contortus* G.

Relation structure-activité des tanins condensés sur les souches résistantes

L'ACP des différentes variables de composition chimique des extraits de TC évalués pour leur effet anthelminthique, avait pour objectifs de discriminer les profils de variables de composition chimique, de dégager les principaux indicateurs potentiellement en lien avec les

effets et d'étudier les corrélations. Ont été pris en compte comme critères d'analyse, les composantes principales présentant une valeur propre supérieure à 1, et les facteurs de somme ou de prépondérance supérieurs à 0,70.

Une variance cumulée de 80,12% a été obtenue avec les deux premières composantes. Les variables qui expliquent le mieux la variance dans la première composante (38,97%) sont la composition en prodelphinidines (PD) issues des TC, négativement corrélé ; et en flavanols libres, prodelphinidines libres, et TC de stéréochimie Cis, qui présentent une relation positive entre elles (respectivement : -0,857 ; 0,782 ; 0,914 ; 0,873. D'autre part, la deuxième composante a extrait une variance de 17,64%, qui est principalement expliquée par le degré de polymérisation des TC (coefficient de corrélation 0.954). De cette analyse, il découle que les critères de nature (composante 1) et de taille (composante 2) des TC, sont des éléments importants permettant de les discriminer.

D'autre part, la corrélation de Pearson montre une corrélation positive significative entre CE50 et %TC (0.644 ; $P=0.033$) et une tendance vers une corrélation positive entre CE50 et %TC-PD (0.536 ; $P=0.089$). Les tests *in vitro* corrélés à la composition chimique des TC mettent en évidence que les souches de parasite sensibles aux TC sont aussi sensibles à l'IVM et au LEV. De plus, la souche résistante à LEV et IVM est aussi résistante aux TC 3, 5, 6 et 8. Cette souche est aussi sensible aux TC 1, 2, 4 et 7.

Les effets anthelminthiques des produits de synthèse sont significativement négativement corrélés à l'efficacité des tanins condensés. En d'autres termes, la résistance aux anthelminthiques de synthèse est significativement négativement corrélée à la sensibilité aux TC. En effet, on observe respectivement les corrélations suivantes ($P<0.05$) entre l'efficacité des TC sur le dégainement et la migration larvaire en présence de IVM, LEV, MOX et THIA : -0.672 ; -0.665 ; -0.628 et -0.424.

IV-Discussion

L'évaluation des souches du parasite *H. contortus* a montré une variabilité en termes de résistance aux anthelminthiques, mettant en évidence la problématique de résistance dans les élevages de Guadeloupe. Sur les 5 élevages prélevés, dont 3 proviennent de la grande-terre et 2 de la basse-terre, nos résultats ont montré une sensibilité encore présente pour les molécules d'ivermectine et de lévamisole, mais également une résistance à ces mêmes molécules, ainsi qu'à la moxidectine et au thiabendazole. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Mahieu et al., 2014) qui observait en Guadeloupe une résistance au benzimidazole sur 15 fermes, aux avermectine (dont fait partie l'ivermectine) et imidazothiazole (dont fait partie le lévamisole) sur 14/17 et 7/9 fermes enquêtées respectivement, et à la milbemycine (moxidectine) sur 2/9 fermes.

Les plantes testées dans cette étude ont été choisies sur la base de leur variabilité de teneurs et de composition en TC, afin d'évaluer les relations structure-activité. Dans nos essais, où nous avons tenu compte des différents degrés de pureté des extraits afin d'ajuster les concentrations en TC testées, des effets doses ont majoritairement été mis en évidence. Ce résultat, déjà rapporté dans la littérature pour d'autres plantes à TC et réalisé également avec l'essai LEIA sur nématodes (Bahuaud et al., 2006; Brunet et al., 2007), montre qu'il y a bien un effet des TC dans notre cas. Cependant, contrairement aux résultats habituellement retrouvés dans la littérature et démontrant qu'une teneur en PD et un fort mDP augmentaient l'activité anthelminthique (Zeller, 2019), il n'a pas été mis en évidence ici, d'influence négative du degré de polymérisation ou de la teneur en PD, sur l'activité anthelminthique (Efficacité et CE50). De plus, mis à part l'effet-dose, les données n'ont pas permis de démontrer l'effet négatif de la teneur en TC sur l'activité anthelminthique. Des résultats similaires ont été obtenus chez *H. contortus* avec le sainfoin (Quijada et al., 2015), qui montre également des corrélations positives entre CE50 et %TC, et une corrélation négative pour le degré de polymérisation (mDP) et prodelfinidines (PD), non observée par contre dans nos essais. D'autre part, même si nous n'avons également pas mis en évidence de lien entre l'activité observée et la présence des sous-unités galloyls, une corrélation négative, mais non significative a été observée entre la présence de groupements galloyls et la CE50. Les groupements PD et galloyls seraient, d'après la littérature, des éléments structuraux d'importance dans l'activité biologique, et notamment anthelminthique des TC, sur le stade parasitaire évalué ici (Brunet S., 2006; Mueller-Harvey et al., 2019; Zeller, 2019). Les résultats de l'ACP menée ici, confirment d'ailleurs l'importance des paramètres mDP, PD et de la stéréochimie cis-trans, dans la caractérisation des TC.

En outre, l'analyse de la composition chimique des extraits a montré la présence de monomères flavanols libres, dont une fraction à PD, qui pourraient aussi contribuer à l'activité observée, en plus des TC. En effet, (Barrau et al., 2005), a démontré qu'une fraction contenant des TC additionnés de glucosides flavonols avait un effet anthelminthique sur *H. contortus* supérieur à une fraction contenant des TC seuls. Ces composés de structures proches de celles des TC, auraient donc des mécanismes d'action similaires, créant ainsi un

effet de synergie dans l'extrait. Même si elle n'était pas significative, une corrélation négative a été observée lors de notre étude entre la présence de flavanols libres et la CE50. Ainsi qu'une corrélation positive (non significative) avec l'efficacité sur le dégagement larvaire d'*H. contortus*. D'autre part, l'ACP a mis en évidence l'importance de ce paramètre pour la discrimination des données.

Ces résultats ne reflètent pas forcément les données communément rapportées par la littérature. Cependant, il est à souligner que concernant les TC, et leurs activités, il existe de nombreuses exceptions relevées dans la littérature, qui ne suivent pas cette tendance générale (Mueller-Harvey et al., 2019; Zeller, 2019). Ces différences observées sont dues aux variations structurales et de composition (PD, mDP, groupes –OH et galloyls, liaisons interflavanols) des TC qui pourraient influencer sur leur capacité à se lier aux protéines, via des liaisons hydrophobes et hydrogènes. De plus, nos résultats ont été obtenus sur des souches résistantes aux anthelminthiques, dont le métabolisme est différent face aux drogues anthelminthiques, ce qui pourrait expliquer ces différences observées.

Les résultats de l'étude de caractérisation de l'activité des TC sur les souches résistantes aux anthelminthiques de synthèse, suggèrent que la sensibilité aux TC serait liée à la sensibilité aux ivermectine et lévamisole, voire à la moxidectine. De plus, on observe que plus la souche est résistante, plus elle résiste aux TC. En effet, ce sont les extraits les plus pauvres en TC, auxquels les souches résistantes sont les plus sensibles (CE50 plus basse). Ainsi, l'hypothèse d'un mécanisme de résistance commun, voire d'une même cible ou d'un même mécanisme d'action des TC et des ivermectine et lévamisole, pourrait être émise. Les mécanismes d'actions de ces molécules ciblent des fonctions biochimiques comme la transmission nerveuse synaptique pour le lévamisole, l'ivermectine et la moxidectine ; ou les microtubules pour les benzimidazoles. Du fait de la relation observée entre la sensibilité aux TC et aux ivermectine et lévamisole, il pourrait être intéressant d'explorer ces cibles afin de prévenir une éventuelle apparition de résistances aux TC. D'autre part, les différences d'effet observées entre souches pourraient également être dues à d'autres mécanismes d'actions, qui seraient en lien avec la complexité structurale des TC. En effet, du fait de leurs structures diverses et multiforme, les TC peuvent se complexer avec une multitude de protéines et composés peuvent donc se montrer multi-cibles (Zeller, 2019).

D'autre part, de multiples facteurs peuvent affecter l'action des drogues anthelminthiques et conduire à la résistance : une perte de cible, la compétition des substrats pour les récepteurs, le métabolisme de la drogue, une augmentation de la réparation cellulaire, ou l'efflux de la drogue par des transporteurs. Il a été démontré in vitro sur le nématode *Ascaris suum*, que les TC peuvent agir par inhibition des glutathion-S-transférases, qui jouent un rôle important dans la détoxification des composés xénobiotiques (Hansen et al., 2016). Ainsi, si c'est ce mécanisme d'action qui a lieu également chez HC, alors la résistance aux TC pourrait se manifester par exemple, par une non production, l'élimination métabolique ou par efflux de l'enzyme ou du TC, la compétition pour l'interaction avec l'enzyme... Dans le cas des imidothiazoles (lévamisole), la résistance d'origine polygénique serait due à des altérations au niveau de la cible de la drogue, que sont les récepteurs cholinergiques (Kotze and Prichard, 2016). Dans le cas des lactones macrocycliques (ivermectine), le mécanisme n'est pas encore

élucidé, mais plusieurs hypothèses sont émises parmi lesquelles une amplification des voies d'efflux de la molécule, via une sur-expression de P-glycoprotéines ; ou alors l'altération des canaux ioniques chlorure glutamate. Pour les benzimidazoles, la résistance se manifeste par une perte d'affinité de la drogue avec sa cible β -tubuline, via une mutation (Kotze and Prichard, 2016). Ces mêmes mécanismes de résistance pourraient être impliqués dans les effets observés sur les souches et les TC évalués dans notre étude. Leur étude pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des TC, s'ils sont les mêmes que certaines molécules anthelminthiques.

V-Conclusion

Il s'agissait dans notre étude, de caractériser des souches du parasite *H.contortus* pour leur résistance aux produits anthelminthiques de synthèse, d'une part, et pour leur sensibilité aux tanins condensés d'autre part, et d'évaluer les relations structure-activité.

Les souches caractérisées sont majoritairement sensibles à l'ivermectine et au lévamisole et présentent une résistance au thiabendazole. Sur les 5 souches testées, une est résistante à tous les anthelminthiques de synthèse évalués.

Les TC peuvent être utilisés pour lutter contre ces parasites résistants aux anthelminthiques de synthèse, mais avec des efficacités variables. Cette variabilité serait liée à la complexité structurale des tanins condensés et à la présence d'autres composés actifs dans les extraits de plantes, mais aussi à la nature de la résistance des parasites, qui pourrait affecter les interactions tanins-protéines.

Il convient maintenant d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action de ces composés en lien avec les caractéristiques de résistance, afin d'optimiser l'utilisation des plantes à tanins condensés en élevage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acuña, H., A. Concha, and M. Figueroa. 2008. Condensed tannin concentrations of three *Lotus* species grown in different environments. *Chil. J. Agric. Res.* 68:31–41. doi:10.4067/S0718-58392008000100004
- Aerts, R.J., T.N. Barry, and W.C. McNabb. 1999. Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agric. Ecosyst. Environ.* 75:1–12. doi:10.1016/S0167-8809(99)00062-6
- Aguerre, M.J., M.C. Capozzolo, P. Lencioni, and M.A. Wattiaux. 2016. Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:4476–4486. doi:10.3168/jds.2015-10745
- Bahuaud, D., De Montellano, C.M.O., 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.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005, Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 131, 531-538.
- Brunet, S., Aufrère, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007, The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both in vitro and in vivo. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Brunet S., H.H., 2006, Monomers of Condensed Tannins Affect the Larval Exsheathment of Parasitic Nematodes of Ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7481-7487.
- Kotze, A.C., Prichard, R.K., 2016, Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis, In: Elsevier (Ed.) *Advances in Parasitology*. Academic Press.
- Mahieu, M., Ferré, B., Madassamy, M., Mandonnet, N., 2014, Fifteen years later, anthelmintic resistances have dramatically spread over goat farms in Guadeloupe. *Vet. Parasitol.* 205, 379-384.
- Molan, A. L.; Sivakumaran, S.; Spencer, P. A.; Meagher, L. P. Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Res. Vet. Sci.* 2004, 77, 239–243.
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., Lüscher, A., Niderkorn, V., Pellikaan, W.F., Salminen, J.-P., Skøt, L., Smith, L.M.J., Thamsborg, S.M., Totterdell, P., Wilkinson, I., Williams, A.R., Azuñwi, B.N., Baert, N., Brinkhaus, A.G., Copani, G., Desrues, O., Drake, C., Engström, M., Frygas, C., Girard, M., Huyen, N.T., Kempf, K., Malisch, C., Mora-Ortiz, M., Quijada, J., Ramsay, A., Ropiak, H.M., Waghorn, G.C., 2019, Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants: Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition. *Crop Sci.* 59, 861.
- Novobilský, A.; Stringano, E.; Hayot Carbonero, C.; Smith, L.M. J.; Enemark, H. L.; Mueller-Harvey, I.; Thamsborg, S. M. In vitro effect of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against two cattle nematodes. *Vet. Parasitol.* 2013, 196, 532–537.
- Quijada, J., Frygas, C., Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Hoste, H., 2015, Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6346-6354.
- Saunders, G.I., Wasmuth, J.D., Beech, R., Laing, R., Hunt, M., Naghra, H., Cotton, J.A., Berriman, M., Britton, C., Gilleard, J.S., 2013. Characterization and comparative analysis of the complete *Haemonchus contortus* b-tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes. *Int. J. Parasitol.* 43, 465e475.
- Scheuerle, M.C., Mahling, M., Pfister, K., 2009. Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in small ruminants in Switzerland and Southern Germany. *Wien. Klin.*

- Schwarz, E.M., Korhonen, P.K., Campbell, B.E., Young, N.D., Jex, A.R., Jabbar, A., Hall, R.S., Mondal, A., Howe, A.C., Pell, J., Hofmann, A., Boag, P.R., Zhu, X.Q., Gregory, T.R., Loukas, A., Williams, B.A., Antoshechkin, I., Brown, C.T., Sternberg, P.W., Gasser, R.B., 2013. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. *Genome Biol.* 14, R89.
- Silvestre, A., Cabaret, J., 2002. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 297e300.
- Smeal, M.G., Gough, P.A., Jackson, A.R., Hotson, I.K., 1968. The occurrence of strains of *Haemonchus contortus* resistant to thiabendazole. *Aust. Vet. J.* 44, 108e109.
- Smout, M.J., Kotze, A.C., McCarthy, J.S., Loukas, A., 2010. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e885.
- Storey, B., Marcellino, C., Miller, M., Maclean, M., Mostafa, E., Howell, S., Sakanari, J., Wolstenholme, A., Kaplan, R., 2014. Utilization of computer processed high definition video imaging for measuring motility of microscopic nematode stages on a quantitative scale: "The Worminator". *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 233e243.
- Taylor, M.A., Hunt, K.R., Goodyear, K.L., 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* 103, 183e194.
- Wochenschr. 121 (Suppl. 3), 46e49.
- Waller, P.J., 1997. Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 72, 391e405.
- Walsh, T.K., Donnan, A.A., Jackson, F., Skuce, P., Wolstenholme, A.J., 2007. Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. *Vet. Parasitol.* 144, 304e312.
- Webb, R.F., McCully, C.H., 1979. Resistance of *Haemonchus contortus* to oxfendazole. *Aust. Vet. J.* 55, 347e348.
- Williamson, S.M., Storey, B., Howell, S., Harper, K.M., Kaplan, R.M., Wolstenholme, A.J., 2011. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 180, 99e105.
- Wooster, M.J., Woodgate, R.G., Chick, B.F., 2001. Reduced efficacy of ivermectin, abamectin and moxidectin against field isolates of *Haemonchus contortus*. *Aust. Vet. J.* 79, 840e842.
- Xu, M., Molento, M., Blackhall, W., Ribeiro, P., Beech, R., Prichard, R., 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91, 327e335.
- Zeller, W.E., 2019, Activity, Purification, and Analysis of Condensed Tannins: Current State of Affairs and Future Endeavors. *Crop Sci.* 59, 886.

CHARACTERIZATION OF HAEMONCHUS CONTOURUS PARASITE FOR RESISTANCE TO ANTHELMINTIC SYNTHESIS PRODUCTS AND SENSITIVITY TO CONDENSED TANNINS
--

ABSTRACT:

Today, small ruminant farming is a major economic challenge around the world. However, the emergence of parasite resistance to chemical anthelmintics worldwide threatens this production. The various integrated control axes of gastrointestinal parasitism in ruminants offer several alternatives to chemotherapy, including phytotherapy. The aim of this paper is to evaluate the anthelmintic modes and mechanisms of action of condensed tannins on anthelmintic resistant strains of *Haemonchus contortus* parasite. To do this, a preliminary study on the composition, structure and size of the condensed tannins of the eight plants was carried out. Then an in vitro study was carried out on strains of *haemonchus contortus* on a key process: the L3 stage in order to characterize them.

Following this, a test on L3 larval exsheathment assay was carried out in order to test the effect of these eight purified condensed tannins. Analyses on the effect of CT doses administered, and a follow-up of the kinetics of the larval test were conducted.

It has been observed that these CTs have varying efficiencies. This variability is related to the structural complexity of the condensed tannins and the presence of other active compounds in the plant extracts, but also to the nature of the resistance of the parasites, which could affect the tannin-protein interactions. Other studies will have to be carried out in order to specify these lines of research.

Keywords: Gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, in vitro anthelmintic test, condensed tannin, resistant strain.

CARACTÉRISATION DU PARASITE HAEMONCHUS CONTORTUS POUR SA RÉSISTANCE AUX PRODUITS ANTHELMINTIQUES DE SYNTHÈSE ET SA SENSIBILITÉ AUX TANINS CONDENSÉS
--

RESUMÉ:

Aujourd'hui, l'élevage des petits ruminants constitue un enjeu économique majeur à travers le monde. Cependant, l'émergence de résistances des parasites vis-à-vis des anthelminthiques chimiques à l'échelle mondiale menace cette production. Les différents axes de contrôle intégré du parasitisme gastro-intestinal des ruminants offre plusieurs alternatives à la chimiothérapie dont la phytothérapie. L'objectif de ce mémoire est d'évaluer l'action anthelminthiques des tanins condensés, via la caractérisation de la résistance du parasite *Haemonchus contortus* aux anthelminthiques de synthèse. Pour ce faire, une analyse préliminaire de la composition, la structure et la taille des tanins condensés de huit plantes a été effectuée. Puis une étude de caractérisation *in vitro* a été réalisée sur 5 souches d'*Haemonchus contortus* au stade L3, clef du processus de développement du parasite. L'évaluation de la résistance à 4 anthelminthiques couramment utilisés, a été réalisée via le test d'inhibition de la migration larvaire et l'évaluation de la sensibilité de souches résistantes aux TC des 8 plantes, via le test d'inhibition du dégagement larvaire.

Les résultats indiquent que des TC peuvent être utilisés pour lutter contre les parasites résistants aux anthelminthiques de synthèse (CE50 de 1.36E-6 à 1mg.mL-1), mais avec des efficacités variables et diminuant avec la multi résistance de la souche (- 44% d'efficacité entre la souche la plus résistante et la plus sensible aux TC). Cette variabilité serait liée à la complexité structurale des tanins condensés et à la présence d'autres composés actifs dans les extraits de plantes, mais aussi à la nature de la résistance des parasites, qui pourrait affecter les interactions tanins-protéines. D'autres études devront être menées dans le but de préciser ces pistes de recherche.

Mots-Clés : Nématode gastro-intestinal, *Haemonchus contortus*, test anthelminthique *in vitro*, tanins condensés, résistance anthelminthique.