Contrôle du pouvoir infestant de strongles gastro-intestinaux soumis à un traitement par les tanins condensés

Loïna Joachim

▶ **To cite this version:**

Loïna Joachim. Contrôle du pouvoir infestant de strongles gastro-intestinaux soumis à un traitement par les tanins condensés. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-02960712

HAL Id: hal-02960712
https://hal.inrae.fr/hal-02960712

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.

BTS Bio Analyses et contrôles
Rue Marie-Thérèse-Gertrude, BP 637
97262 Fort-de-France cedex

Contrôle du pouvoir infestant de strongles gastro-intestinaux soumis à un traitement anthelminthique par les tanins condensés

Présenté par Loïna JOACHIM

Maitre de stage : Mme. Carine MARIE-MAGDELEINE

Tuteur : M. Lucien PHILIBERT

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de mon stage et qui m'ont aidée à compléter mon rapport de stage.

Je remercie particulièrement **Mme Carine MARIE-MAGDELEINE** Directrice de recherches ainsi que mon tuteur de stage **M L. PHILIBERT** Technicien pour sa disponibilité et son dévouement.

Sans oublier, l'équipe de l'unité URZ (Unité de Recherches Zootechniques) et ses techniciens pour leur accueil et le partage de leur expérience.

Enfin, je remercie mes professeurs **M C. ANGLIONIN** et **Mme H. BERNARD** du lycée de BELLEVUE pour m'avoir aidée dans la recherche de mon stage et qui m'ont permis de postuler dans mon entreprise d'accueil.

Et également à mes parents proches pour m'avoir accueillie durant ces deux mois en Guadeloupe mais aussi pour m'avoir conseillée et offert une aide précieuse dans la rédaction de ce rapport de stage.

Résumé

L'élevage traditionnel des petits ruminants sont très répandu aux Antilles ainsi que dans les pays tropicaux. La perte de production chez les petits ruminants est essentiellement due aux nématodes gastro-intestinaux qui sont transmis. Les strongles digestifs transitent dans la caillette et entrainent des **retards de croissance**, de l'amaigrissement, des diarrhées pouvant être sévères et des baisses de production. Le contrôle de ces infestations repose sur l'utilisation des anthelminthiques cependant, l'usage très fréquentes des molécules anthelminthique a pour répercussion ; une augmentation de la résistance des strongles gastro-intestinaux face aux traitements. Depuis plusieurs années, des baisses d'efficacité ont été recensés. Une étude montre que 100% des populations de nématodes sont résistantes aux benzimidazoles ainsi qu'à la majorité des familles d'anthelminthiques. Nous étudierons à partir de nos connaissances des systèmes de contrôle des parasites.

Tables des matières

Introduction 6

I. Présentation de l'entreprise 7

Partie I 9

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE 9

I. Les strongles gastro-intestinaux 10

I.1 Les espèces de strongles 10

I.1.1 Les principales espèces 10

I.2 *Haemonchus contortus*, strongles gastro-intestinaux 11

I.2.1 Classification 11

I.2.2 Cycle biologique 11

I.2.3 Pathogénécité 13

II. La phytothérapie contre les nématodes 14

II.1 La phytothérapie 14

II.2 Les molécules anthelminthiques 15

II.3 Utilisation des tanins condensés 15

II.3.1 Structure 15

II.3.2 Principe 15

II.3.3 Ses propriétés 16

II.4 Résistance face aux traitements anthelminthiques 16

Partie II 17

PARTIE EXPERIMENTALE 17

I. Matériels et méthodes 19

I.1 *Matériels* 19

I.1.1 Le parasite utilisé : Haemonchus Contortus 19

I.1.2 Animaux post sevrage 19

I.1.3 Les plantes 19

I.2 *Méthodes* 19

I.2.1 Test de développement larvaire (LDA) 19

I.2.2 Test de dégainement 21

I.2.3 Test de migration 22
I.2.4 Analyses statistiques 23
II. Résultats-Discussion 24
II.1 Test de développement larvaire 24
II.2 Test de dégainement 25
II.3 Test de migration 26
III. Conclusion 27
Apport personnel 28

Introduction

Les strongyloses gastro-intestinales sont une pathologie chez les petits ruminants causée par les strongles gastro-intestinaux appelés aussi nématodes gastro-intestinaux. Cette maladie entraine de fortes pertes de production. Les températures tropicales facilitent le développement des strongles les plus pathogènes comme *Haemonchus Contortus*, qui provoquent des pertes économiques pour les agriculteurs du monde entier. Les traitements par anthelminthiques sont utilisés pour contrôler et maitriser les infestations cependant l'utilisation excessive a causé l'apparition de résistance des parasites face aux anthelminthiques.

Aujourd'hui, il devient nécessaire de lutter contre les parasites en trouvant des alternatives plus économiques et plus naturelles comme l'utilisation de plantes. De nombreuses études ont démontré une réduction du parasite chez le mouton, grâce à la consommation de plantes ayant des tanins condensés.

De plus, les études expérimentales in vivo utilisant des extraits de quebracho (une source très riche en tanins condensés) ont confirmé les premiers résultats obtenus avec des plantes à tanins condensés (Athanasiadou et al., 2001). Par ailleurs, plusieurs plantes à TC possèdent une activité anthelminthique, alors que d'autres n'en n'ont pas (Pomroy and Adlington, 2006).

Le but du stage est donc de contrôler le pouvoir infestant du parasite : *Haemonchus Contortus* soumis à un traitement anthelminthique par les tanins condensés.

I. Présentation de l'entreprise

A. Les missions et objectifs

L'Unité de Recherches Zootechniques (URZ) a été créé en 1965 et est associée au Département de Génétique Animale. L'URZ a pour objectif l'amélioration des productions animales en milieu tropical humide, avec pour finalité de produire des connaissances, des méthodes, des technologies et des innovations.

L'Unité de Recherches Zootechniques (URZ) est l'une des unités présentes sur le site de l'INRA Antilles Guyane et ingénieurs. L'URZ travaille en étroite collaboration avec la Plateforme Tropicale d'Expérimentation Animale (PTEA). Cette plateforme se décompose en deux parties :

- Le domaine de Gardel en Grande Terre qui accueille les expérimentations en production bovine et caprine sur le pâturage et en pathologie parasitaire.
- Le domaine de Duclos qui permet les études d'adaptation des porcs au milieu tropical et les études d'alimentation et de pathologie.

Les espèces étudiées sont en majorité des ruminants et des monogastriques. Les travaux réalisés par l'unité de zootechnie ont pour principe l'amélioration des productions animales dans la zone tropicale humide. Ses compétences concernent principalement la Guadeloupe et la Martinique, mais s'étendent également à la région Caraïbe et au milieu tropical dans son ensemble. Les programmes ont pour objectif l'alimentation et les systèmes de pâturage incluant les pathologies parasitaires, en particulier les relations entre le climat et l'alimentation, et l'amélioration génétique des populations animales locales.

L'URZ collabore avec plusieurs partenaires scientifiques régionaux dont l'Université des Antilles, Université de Guyane, CIRAD etc. et les réseaux caribéens et internationaux.

En raison de l'absence d'instituts techniques dans les DOM, la station de zootechnie a aussi pour mission d'appuyer les initiatives locales et régionales (Guadeloupe et Martinique) en matière de production animale : référentiels techniques, appuis techniques et contrôles de performances, plan d'amélioration génétique, plan d'alimentation.

B. Les activités collectives

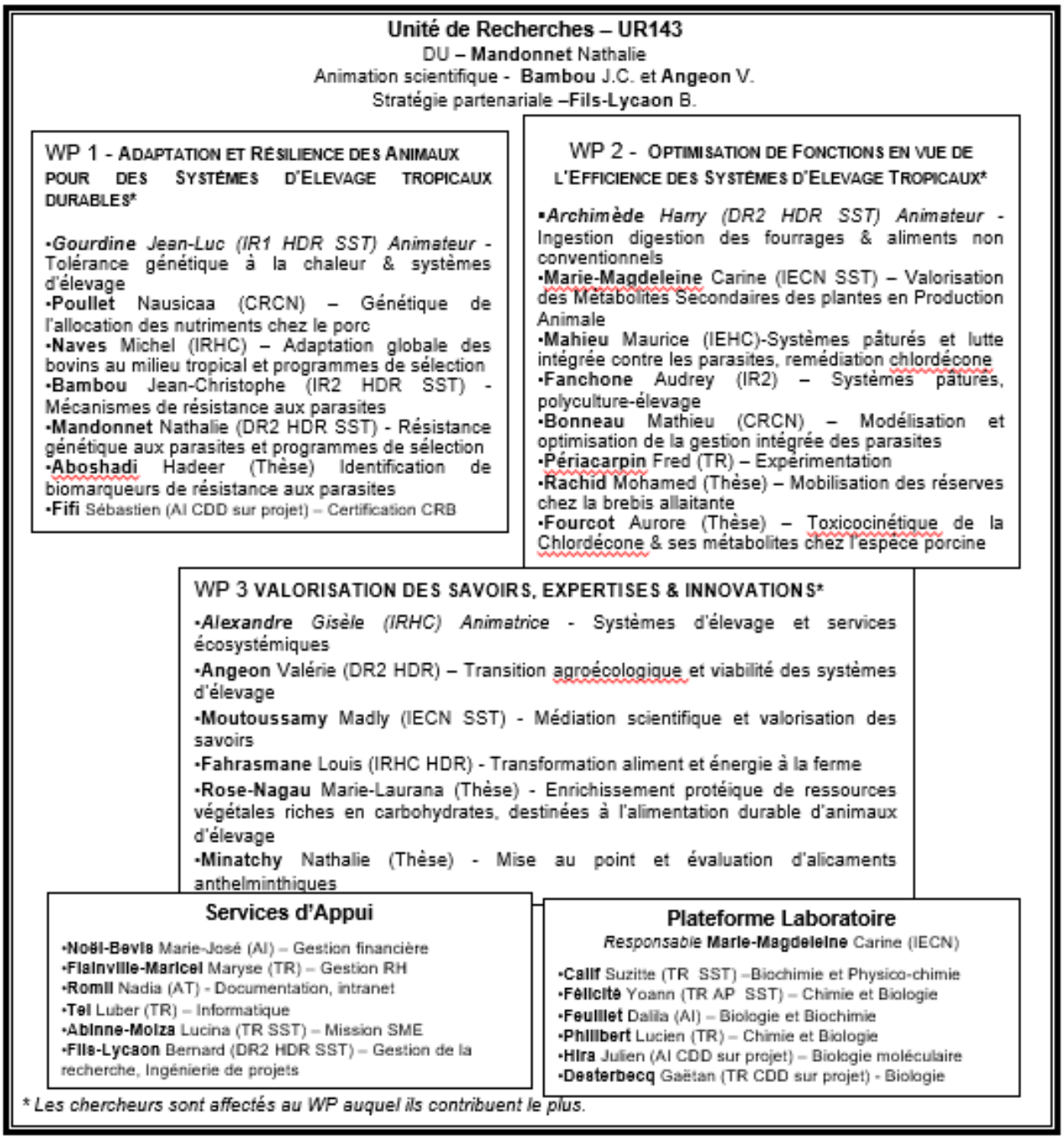
Le centre INRA Antilles-Guyane est divisé en 3 parties :

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

L'unité URZ se spécialise dans les activités collectives spécialise dans les activités collectives d'appui qui sont :

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

C. Organigramme du personnel



Partie I

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les strongles gastro-intestinaux

L'élevage traditionnel caprin aux Antilles est très répandu. Le cabri de Guadeloupe est un animal très populaire dans l'île, il s'agit d'une espèce locale qui est notamment utilisée lors de fêtes ou de concours.

Le cabri est essentiellement élevé pour être consommé, sa viande à la particularité d'être moins forte que celle de l'adulte ce qui explique que c'est uniquement lui qui est élevé pour produire de la viande.
En Guadeloupe la tradition ne déroge pas à la règle et le cabri est utilisé pour préparer de nombreux plats, notamment des ragouts.
Très spectaculaire, la compétition en Guadeloupe est également l'occasion de participer à des repas ou le plat principal est composé de ragout ou de Colombo de cabris. Le cabri peut être également consommé en grillades ou en brochettes et il est possible de trouver da viande en vente dans les boucheries aux environs des fêtes de Pâques.
Le cabri créole pèse en moyenne 28 kilos pour les femelles et 38 kilos pour les mâles. Il s'agit de l'une des meilleures chèvres de la zone tropicale du fait de sa facilité à se reproduire et de la faible période de gestation des femelles.

I.1 Les espèces de strongles

I.1.1 Les principales espèces

Le mot nématode vient du grec « nêma » qui signifie fil et de « eidos » qui signifie apparence.
Cette simple description suffit à définir un phylum entier comprenant plus de 20 000 espèces décrites et dont les estimations actuelles révèlent qu'il pourrait en contenir plusieurs millions (Blaxter et al., 1998, Hugot et al., 2001).

Certaines espèces évoluent librement dans le milieu extérieur, d'autres ont besoin d'infester un hôte soit un animal ou un végétal pour leur développement afin de survivre.

Les nématodes ont en général une forme cylindrique avec une extrémité plus fine au niveau de la queue et plus large au niveau de la tête. La forme générale du nématode est maintenue par un hydrosquelette. Il possède un système d'excrétion /sécrétion qui permet une osmorégulation* pour le maintien de l'intégrité structurale du ver.

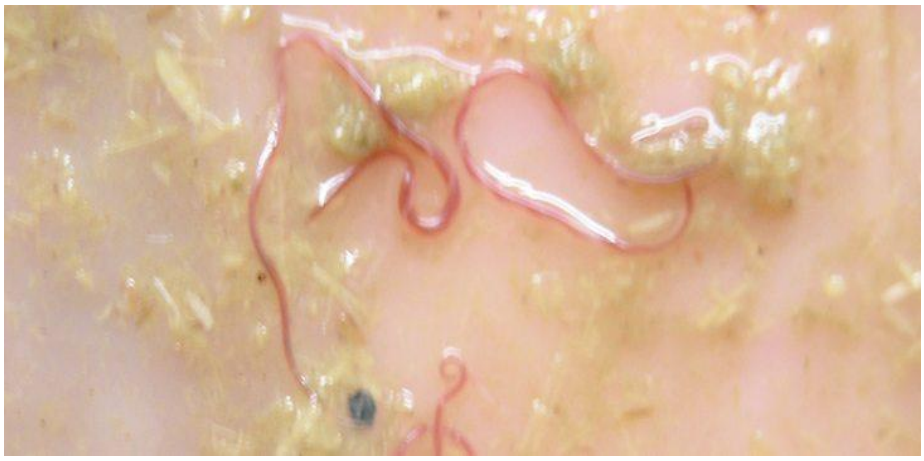


Figure I.1.1 : Haemonchus Contortus à la surface de la caillette

I.2 *Haemonchus contortus*, strongles gastro-intestinaux

H.contortus est un parasite principalement retrouvé dans les zones climatiques tropicales comme l'Afrique, l'Amérique centrale.

I.2.1 Classification

On regroupe sous le terme de Strongles digestifs des parasites Nématodes de l'ordre des Strongylida, appartenant à :
- la super-famille des Strongyloidea
- famille des Strongylidés, sous-famille des Oesophagostominés
- famille des Ankylostomatidés, sous-famille des Bunostominés
- la super-famille des Trichostrongyloidea, famille des Trichostrongylidés (genres Haemonchus, Nematodirus, Ostertagia et Trichostrongylus).

I.2.2 Cycle biologique

Le cycle biologique des vers *Haemonchus contortus* se déroule en deux phases. La première phase sera la **phase libre (phase exogène)** qui se déroulera dans le milieu extérieur et la phase parasitaire **(phase endogène)** qui se fera dans la caillette du ruminant.

- **La phase exogène**

Les femelles adultes pondent des œufs dans l'estomac de l'hôte, qui se retrouveront par la suite dans les fèces de l'animal. Les œufs, excrétés ont une température optimale de développement de 20-30°C (Veglia, 1916); toutefois, ils ne se développent pas lorsque la température est trop basse (Coyne et Smith, 1992a) d'où une forte mortalité au stade œuf dans des régions où les températures hivernales sont inférieures à 5°C.

Une fois dans l'environnement et si les conditions extérieures sont favorables, les œufs vont éclore en environ 24 heures pour donner des larves L1. Ces larves muent et deviennent des larves au stade

L2 puis L3 en **4 à 7 jours**, cependant la mutation est alors incomplète car la larve possède toujours sa gaine. Celles-ci seront alors des larves mobiles et **infestantes**, généralement résistantes dans le milieu extérieur en raison de la présence de lipides dans leurs cellules intestinales (Veglia, 1916).

- **La phase endogène**

Les larves de stade L3 seront capables de grimper sur les parties aériennes des feuilles et les tiges où elles seront ingérées par les ruminants. Celles-ci vont alors perdent leur gaine. Elles pénètrent par le tube digestif et se fixent dans la caillette où elles muent en larves L4 où il y aura une différenciation des individus mâles et femelles avant d'atteindre le stade L5 c'est-à-dire le stade adulte. Après la maturation sexuelle, les vers adultes s'accouplent et les femelles pondent des œufs qui se retrouveront par la suite dans les excréments de l'animal, ce qui va causer une nouvelle source de contamination du pâturage.

La période pré patente (délai entre l'infection et la première ponte des œufs) est de **19 à 21 jours** après la digestion des parasites. C'est une période assez courte qui permet plusieurs générations au cours d'une saison.

	Haemonchus Contortus
Présence des larves L3 dans l'organe cible après ingestion	2ème jour
Mue des larves L3 en larves L4	4 ème – 5 ème jours
Evolution des larves L4 en stades 5 juvéniles	9 ème - 11ème jours
Apparition des premiers stades adultes	18 ème jour

Tableau I.2.2 : Cycle biologique de l'H.Contortus

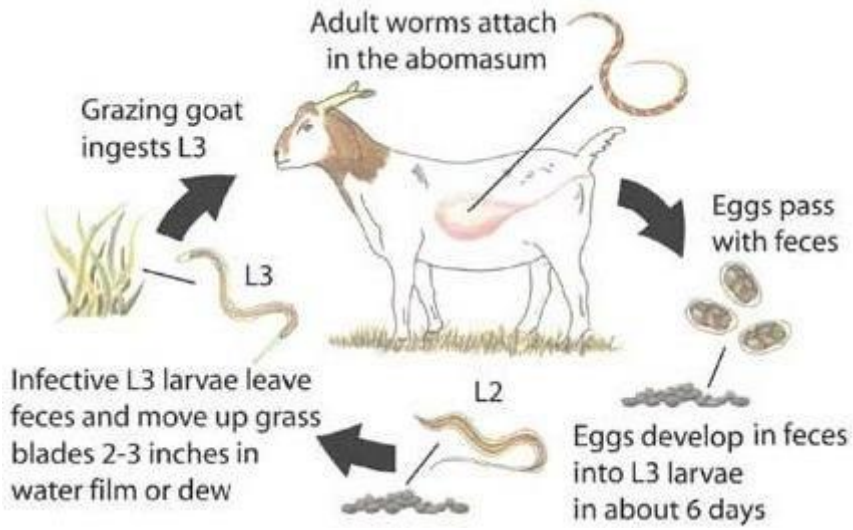


Figure I.2.2 : Schéma du cycle biologie

I.2.3 Pathogénécité

I.2.3.1 *Les symptômes*

L'essentiel du pouvoir pathogène d'*H. contortus* est dû à son mode de nutrition hématophage qui provoque un syndrome d'anémie sévère. Chaque vers aspire environ **0,05 ml de sang par jour**.

L'Haemonchose se caractérise sous trois formes :

- 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,
- Hamonchose aiguë : elle se caractérise par une anémie et d'un œdème sous-glossien appelé « œdème de bouteille » et d'hypo protéinémie (faible concentration de protéines dans le sang), peut causer la mort subite,
- Haemonchose chronique : C'est le cas le plus répandu. La maladie est alors à l'origine des pertes économiques les plus importantes en raison d'une morbidité élevée. Elle se manifeste aussi par un amaigrissement, une diminution de la productivité laitière et peut provoquer des troubles de fécondité.

I.2.3.2 *Faits physiopathologiques lié à l'infestation des strongles*

Dès 1985, l'INRA Antilles Guyane a mis en évidence en Martinique une souche *d'Haemonchus contortus* (ver de la caillette) résistante au fenbendazole et aux autres anthelminthiques de la classe des benzimidazoles. Cette souche résistante résulte de 6 années d'utilisation systématique du fenbendazole. Dix ans plus tard des enquêtes en ferme réalisées avec le CIRAD (1995) ont montré que la résistance aux benzimidazoles était présente dans la quasi-totalité des troupeaux

guadeloupéens et martiniquais, et que dans certains troupeaux, on trouvait aussi des parasites résistants à l'ivermectine. Une étude similaire réalisée fin 2011 en Guadeloupe montre que sur une vingtaine d'élevages, 100% présentent des parasites résistants aux benzimidazoles, 80% au lévamisole, 80% à l'ivermectine, et déjà près de 20% à la moxidectine, le dernier médicament apparu sur le marché. Une tentative de substitution des populations de parasites résistants par des parasites sensibles s'est avérée peu durable, des résistances aux benzimidazoles, au lévamisole et à l'ivermectine ayant été observées en 2 à 3 ans d'utilisation.

I.2.3.3 *Réponse immunitaire face à l'infestation des strongles*

La réponse immunitaire est composée de deux composantes :

- **la réponse immunitaire innée** : ensemble des phénomènes non spécifiques rapidement mis en place pour lutter contre un pathogène. Ils sont parfois insuffisants pour éliminer le pathogène. Dans laquelle des mécanismes non spécifiques contre un pathogène sont rapidement mis en œuvre. L'immunité naturelle n'est pas toujours suffisante pour éliminer le pathogène, mais elle est indispensable pour mener à bien une première défense en attendant que l'immunité adaptative prenne le relais.
- **la réponse immunitaire acquise** : dans laquelle des réponses plus tardives et très spécifiques du pathogène rencontré sont mises en jeu. Cette réponse présente à la fois un haut degré de spécificité ainsi que la remarquable propriété de « mémoire » : la réexposition à un même antigène a pour conséquence une réponse mnémonique plus rapide et souvent plus efficace pour neutraliser l'agent pathogène en cause.

Les effets de cette réponse immune de l'hôte face aux nématodes peuvent s'observer :

- Expulsion des vers, deux à trois semaines après l'infestation
- Réduction de la taille des vers
- Diminution de la fécondité des révélées par une diminution de l'intensité de l'excrétion d'œufs dans les matières fécales
- Arrêt du développement des larves ou hypobiose
- Résistance à l'établissement de nouvelles larves, réponse contre les larves

II. La phytothérapie contre les nématodes

II.1 La phytothérapie

La phytothérapie a pour principe l'utilisation de **plantes médicinales** à des fins thérapeutiques. En médecine classique, les fabricants pharmaceutiques extraient le principe actif des plantes pour en faire des médicaments. C'est une solution à la fois alternative et complémentaire aux traitements de la médecine classique.

Plusieurs plantes ont des propriétés anthelminthiques. Leur utilisation faisait d'ailleurs partie des pratiques traditionnelles des éleveurs avant l'adoption généralisée des vermifuges de synthèse.

II.2 Les molécules anthelminthiques

L'utilisation des anthelminthiques permet d'avoir une action sur la phase parasitaire. On trouve trois grandes familles de molécules anthelminthiques à large spectre dont : les imidazothiazoles et les tétrahydropyrimidines, les benzimidazoles et les lactones macrocycliques.

- les Benzimidazoles ont pour action la désintégration des microtubules des cellules intestinales des nématodes et d'inhibition de la polymérisation de la tubuline.
- les Imidazothiazoles et Tétrahydropyrimidines minent l'action de l'acétylcholine et provoquent des contractions musculaires puis une paralysie, ce qui permet l'expulsion du parasite.
- les lactones macrocycliques agissent sur les canaux chlorures glutamate dépendants ce qui entraine une hyperpolarisation de la cellule nerveuse ou musculaire, provoquant ainsi une paralysie flasque du parasite.

II.3 Utilisation des tanins condensés

Le terme phytothérapie vient du grec « phuton » qui signifie plantes et « therapeia » qui signifie traitement. Depuis quelques années, la phytothérapie est devenue une pratique ancestrale. Il s'agit d'une méthode utilisant des plantes afin de traiter certaines pathologies.

II.3.1 Structure

Les **tanins condensés** appelés également oligomères proanthocyanidoliques sont des polymères de flavanols qui sont constitués d'unités de **flavan-3-ols** liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Leur structure chimique est très variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; on les classe en : *tanins hydrolysables,* qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique, soit de l'acide ellagique ; *tanins condensés,* non hydrolysables.

II.3.2 Principe

La phytothérapie est une médecine naturelle qui repose sur l'utilisation de **plantes médicinales** à des fins thérapeutiques. Cette méthode consiste à utiliser les principes actifs des plantes pour prévenir ou soigner certaines problématiques.

II.3.3 Ses propriétés

Les tanins condensés ont un pouvoir d'inhibition ce qui permettra l'impossibilité de dégainement de la larve.

Ils ont également des propriétés physico-chimie tel que :

- anti-inflammatoire,
- antioxydants,
- activité inhibitrice de systèmes enzymatiques,
- vasoconstricteurs et protecteurs vasculaires,
- astringents et anti-diarrhéiques,
- protecteurs et asséchants cutanés,
- antiviraux, antiparasites, antibactériens et antiseptiques (protège les membranes cellulaires lors de la fixation du virus).

II.4 Résistance face aux traitements anthelminthiques

La résistance aux anthelminthiques correspond à une augmentation, dans une population, de la proportion d'individus capables de survivre à une dose d'anthelminthique qui serait létale pour la majorité des individus d'une population sensible de même espèce (BUSVINE, 1981 ; KERBOEUF, 1988 ; BOURDOISEAU, 1992 ; WOLSTENHOLME et al.,2004).

Plusieurs types de résistance ont été décrits selon les capacités des parasites à résister à une substance unique (résistance simple), à un groupe de substances ayant le même mode d'action (résistance de famille) ou à un ensemble de composés qui ont des modes d'action différents (résistance multiple) (Beugnet et Kerboeuf, 1997). Les parasites résistants, préexistants et peu nombreux, sont favorisés par une pression de sélection exercée par l'emploi d'antiparasitaires.

Plusieurs facteurs sont impliqués dans le développement de ces résistances :

- L'utilisation de molécules anthelminthiques du même type de molécule augmente la pression de sélection. Le risque maximal est représenté par une utilisation à une fréquence correspondant à la période pré-patente des parasites où chaque génération étant soumise à un traitement. Il est conseillé d'utiliser différentes molécules néanmoins une telle alternance pourrait à long terme, entraîner une résistance multiple,
- Le sous dosage permet la survie d'individus hétérozygotes portant un allèle de résistance.
- Population de vers dit « **population refuge** » qui n'a pas été exposée à la molécule pendant le traitement. Plus la population refuge est faible, plus les œufs/larves auront un rôle important dans la contamination.

Partie II

PARTIE EXPERIMENTALE

Lot	Souche d'H.Contortus	Nombre d'animaux
Témoin	Sensible alimentation luzerne	5
Manioc	Sensible alimentation manioc	5
Cajan	Sensible alimentation pois d'Angole	5
Leucene	Sensible alimentation leucaena	5
Mélange	Sensible alimentation mélanges	5

Tableau I.1.2 : traitement à base de plantes selon les lots

Figure I.2.1 : Extraction des œufs (Test de développement larvaire)

I. Matériels et méthodes

L'objectif de cette étude est d'étudier le mode d'action anthelminthique des tanins condensés, par l'évaluation, en conditions d'élevage, de l'effet sur **le pouvoir infestant d'*H. Contortus***, obtenu sur des animaux ayant été nourris avec des plantes ayant des tanins condensés.

I.1 Matériels

I.1.1 Le parasite utilisé : Haemonchus Contortus

Pour notre étude, nous avons utilisé le parasite ***H. Contortus*** qui est une espèce très pathogène du fait de son **caractère hématophage**.
En raison de son pouvoir pathogène, *H. contortus* est l'espèce la plus étudiée. Elle est très souvent retrouvée dans de nombreux élevages à travers le monde. C'est ainsi que cette espèce sert de modèle d'étude pour les strongles digestifs.
Pour avoir les larves, nous avons récupéré les fèces de 5 lots d'animaux issus d'un précédent protocole. Les animaux ont été infestés lors de ce précédent protocole, avec une souche identique d'*Haemonchus contortus*. Chaque lot a été nourri avant et pendant la période précédant l'excrétion des œufs, avec une plante connue pour posséder des tanins. Lors de la période d'excrétion, les fèces ont été récupérés et mise en culture afin de récupérer les larves L3 (voir cycle). Nous avons, à partir d'une souche unique, caractérisé 5 souches différentes de par la nourriture des animaux.

I.1.2 Animaux post sevrage

Nous avons choisi les chevreaux. Nous utilisons 25 chevreaux mâles post sevrages issus du pâturage divisés en 5 lots. Ces animaux ont été traités avec des molécules chimiques afin de s'assurer de l'absence de tout parasite. Ils ont été ensuite infestés avec 5000 larves au stade L3, chaque lot de 5 recevant une souche différente d'*H. Contortus*, provenant de cabris infestés et soumis à un traitement anthelminthiques à base de plantes contenant des tanins condensés : manioc, pois d'Angole, leucaena et un mélange des 3 plantes. Le dernier lot a été infesté avec des larves issues d'animaux nourris à la luzerne et qui sert de témoin.

I.1.3 Les plantes

Les plantes qui ont été choisies pour l'alimentation des animaux et qui sont connus pour posséder des tanins sont : le manioc, le pois d'Angole, le leucaena et un mélange des 3 plantes (manioc, pois d'Angole et leucaena). La luzerne est considérée comme la plante comme témoin car ne possédant pas de tanins.

I.2 Méthodes

I.2.1 Test de développement larvaire (LDA)

Principe

Le test de développement larvaire permet de mettre en contact des molécules chimiques avec des larves de parasite au stade L1 et de suivre leur développement.

Manipulation

1) Extraction des œufs

Cette méthode consiste dans un premier à extraire des œufs de larves afin d'avoir **5 000 œufs**.
On utilise des tamis de différentes tailles pour extraire les œufs. Préalablement, on aura broyé les fèces afin de faciliter l'extraction. Le dernier tamis est un tamis de porosité 0,32µm qui retient les œufs. On récupère les œufs sur le tamis avec de l'eau, le filtrat obtenu sera centrifugé à 2 800 tours/min pendant 15 min. Après la centrifugation, on retire le surnagent et on ajoute 35 ml de solution NaCl de densité 1,2. La solution de NaCl à cette densité permet la flottation des œufs. On centrifuge de nouveau pendant 15 min à 2800 tours/min puis on verse les œufs sur un tamis de 32 µm. On rince le tamis à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée et à l'eau bi-distillée. On met le filtrat dans un flacon de 50 ml. Les œufs ont été comptés au microscope afin de déterminer la solution de travail.

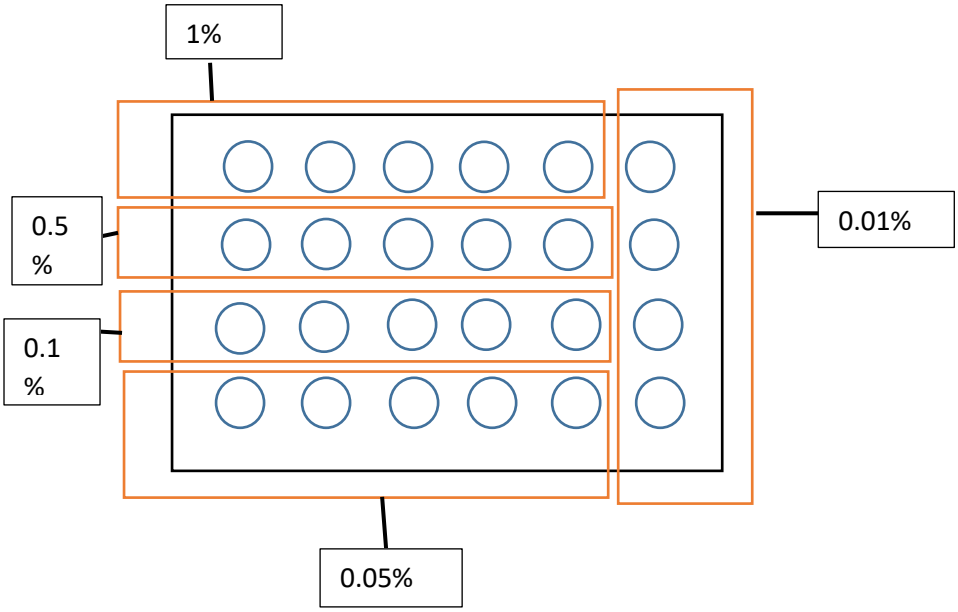
2) Test de développement larvaire

Pour 1 boîte : prélever un volume Y d'œuf et ajouter 22.5µL de solution *E.coli*, 9 µL de Fungizone 200 et compléter à 15 mL de PBS puis laisser incuber les œufs pendant 48 heures.
Ajouter 70 µL de milieu Earle préalablement préparé dans chaque puits et 0.5 mL de molécule chimique par puits. Chaque concentration a été répétée 5 fois, sauf pour la plus faible concentration où il y a eu 4 répétitions.

N.B : Nous utiliserons 5 souches (luzerne, pois, mélange, manioc, leucaena) et 3 molécules chimiques (Ivermectine, Thiabendazole et Albendazole). Il y aura 5 boîtes pour chaque souche dont 3 contiendront les différentes concentrations de molécules chimiques.

Après 10 jours, on stoppe le développement en ajoutant du Lugol dans chaque puits.

Répartition des différentes concentrations :



Boite n°1= Témoin Luzerne 1re test
Boite n°2 = témoin Luzerne
Boite n°3 = Ivermectine
Boite n°4 = Thiabendazole
Boite n°5 = Albendazole

3) Lecture et Calcul

Après agitation, la totalité du puits a été prélevé sous forme de gouttes pour être compté au microscope. Il s'agit de compter les larves en différenciant le stade L1/L2 du stade L3. Nous avons commencé par la concentration la plus faible. Nous avons arrêté la lecture dès lors que nous avons trouvé une concentration où les larves L1 n'avaient pas évolué.

$$\frac{(L1 + L2)}{(L1 + L2 + L3)} * 100$$

I.2.2 Test de dégainement

Principe

Ce test est mis en place dans le but de tester l'effet de certains extraits sur le dégainement des larves L3 d'*Haemonchus Contortus*.

Manipulation

Cette méthode consiste à préparer une solution de NaCl de concentration 16.6% et une solution d'eau de Javel à 2.6% que l'on va associer afin d'obtenir la solution NaCl/Javel. Celle-ci sera diluée au 1/150^{e} dans du PBS.

Pour chaque souche de parasites : mettre dans un eppendorf de 2mL, 1mL de la solution larvaire à 1 000 L3/mL et 1mL de solution NaCl/Javel diluée au 1/150^{e}. Mettre les tubes sous agitation. Prélever toutes les 10 min pendant 70 min (ayant comme point de départ 0 min), 200µL dans chaque tube que l'on va transférer dans un tube contenant 20µl de Lugol.

Calcul

$$\frac{\text{Nbre de larves dégainées}}{(Nbre\ de\ larves\ dégainées + Nbre\ de\ larves\ gainées)} * 100$$

I.2.3 Test de migration

Principe

Les larves entrent au contact d'extraits de plantes pendant 3 heures et sont ensuite déposées sur un tamis et laissées incuber pendant 3 heures.

Manipulation

Cette méthode consiste à distribuer Y mL de solution larvaire qui correspond à chaque tube et même quantité de solution anthelminthique correspondant puis de laisser incuber pendant 3h à température ambiante. Mettre les tubes à centrifuger à 4 500 tours/min pendant 5 min après les 3 heures. Retirer le surnageant et ajouter 2mL de PBS puis centrifuger et retirer le surnageant, répéter cette étape 3 fois.

Après les 3 rinçages, retirer le surnageant et ajouter 1 000µL de PBS. Introduire tout le contenu du tube pour le mettre dans le tube contenant l'insert et ayant déjà été réajusté avec du PBS puis laisser incuber pendant 3 heures à température ambiante.

Retirer le contenu de l'insert après les 3 heures d'incubation et retirer délicatement l'insert. Ajuster à 2mL avec du PBS si nécessaire. Puis on va compter le nombre de larves ayant migrées.

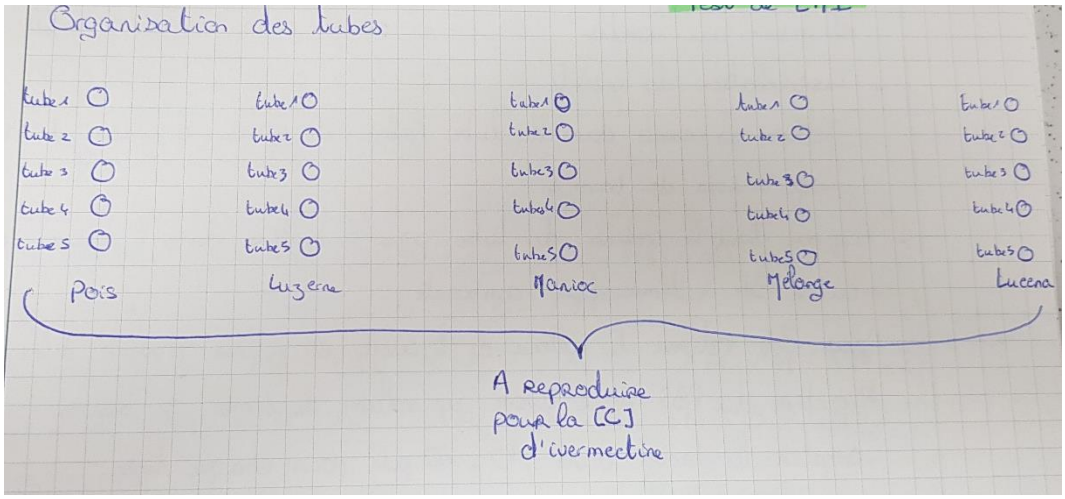


Figure I.2.3 : Organisation des tubes (Test de migration)

Calcul

Détermination du pourcentage brut de L3 ayant migré

$$B = \frac{(Z*X*T)}{N} * 100$$

N : Nombre de larves mises en contact avec les extraits

Z : Nombre de larves ayant migré

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

T : Volume d'ajustement dans les tubes coniques

I.2.4 Analyses statistiques

Les données sont traitées selon une analyse de variance (ANOVA) par la procédure GLM à l'aide du logiciel Minitab Release 16 Software. La valeur P du test statistique permettant de comparer les moyennes (entre traitement et témoin par exemple) est fixée à 95% pour conclure à l'équivalence des moyennes. Quand la valeur P est inférieure à 5%, nous pouvons dire qu'il y a une différence significative entre les moyennes comparées.

II. Résultats-Discussion

II.1 Test de développement larvaire

Ce premier test consiste à observer le développement des larves du stade L1 au stade L3. Ces larves L1 ont été obtenues à partir des œufs du parasite contenues dans les fèces d'animaux. Pour rappel, les larves L3 utilisées pour l'infestation de ces animaux ont été obtenues à partir d'animaux ayant été nourris avec des plantes contenant des tanins condensés et ayant un effet anthelminthique au stade du développement larvaire entre les stades L1 et L3.

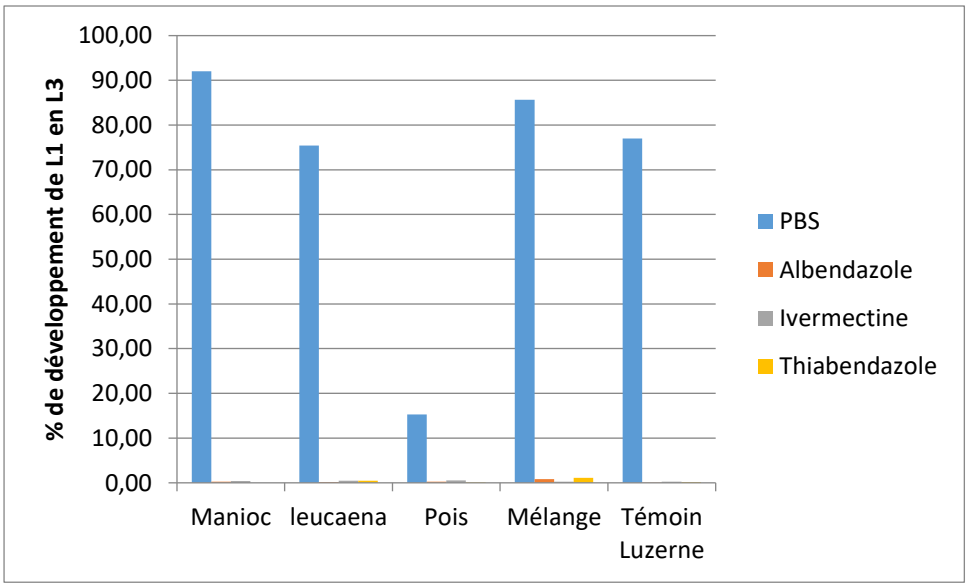


Figure II.1. Effet des molécules anthelminthiques sur le développement larvaire de souches d'*Haemonchus contortus* issues d'animaux ayant ingéré des tanins condensés

Les résultats (figure II.1) font apparaitre que le développement des larves (en milieu PBS), du stade L1 au stade L3, pour les souches issues d'animaux nourris aux manioc, leucaena et mélange (de 75 à 90% de développement) n'est pas significativement différent comparativement à la souche témoin issue d'animaux nourris à la luzerne (P=0.1429 ; 1 et 1 respectivement). On observe cependant une différence significative pour la souche issue d'animaux nourris au pois d'Angole (pourcentage de développement de 15% ; P= 0).

Toutes les plantes n'ont donc pas agi de la même manière sur les souches de parasites, post ingestion par les animaux. Parmi les 3 traitements évalués, seuls les tanins de pois d'Angole impactent le développement larvaire. Nous pouvons faire l'hypothèse que les tanins du pois d'Angole ne seraient pas identiques à ceux des autres plantes et que probablement cette différence porterait sur la structure de la molécule, compte tenu de la complexité des tanins condensés.

D'autre part, concernant l'effet des anthelminthiques de synthèse, la lecture des puits de la concentration 0,01% et 0,05% fait apparaitre que les larves L1 soumises aux molécules

anthelminthiques ne se développent pas, quelle que soit la molécule testée et quelle que soit la souche de parasite. Ce résultat fait apparaître que toutes les souches sont sensibles aux anthelminthiques de synthèse testés. Donc, même après une exposition aux tanins condensés, les souches ne développent pas de résistance aux anthelminthiques de synthèse à la deuxième génération, et ce malgré un effet positif des plantes, comme dans le cas du pois d'Angole.

II.2 Test de dégainement

L'objectif de ce test est d'observer le dégainement des larves infestantes au stade L3. En effet, les larves au stade L3, quand elles sont ingérées par les animaux, perdent leurs gaines pour terminer le cycle du parasite. Ces larves ont été obtenues à partir d'animaux nourris avec différentes plantes à tanins condensés.

Les résultats (fig 11.2) montrent, que mise à part pour la souche leucaena, toutes les courbes sont identiques à celle du témoin luzerne. Il semble que l'absence de dégainement à 30 min pour les larves issues d'animaux nourris avec le mélange de plantes soit liée à une erreur de manipulation. En effet, après la mise en contact de ces larves avec la solution NaCl- Eau de Javel, on obtient 100% de dégainage au bout de 60 min. La conclusion à tirer est que pour toutes les souches de parasite obtenues dans les conditions précitées, il n'y a pas d'inhibition du dégainement des larves au stade infestant L3. Cependant, un effet de ralentissement du dégainement est observé sur la souche issue des animaux nourris au leucaena. En effet, on observe que ces dernières ne sont dégainées à 100% qu'au bout de 70min comparativement au témoin qui atteint 100% de dégainement au bout de 60 min.

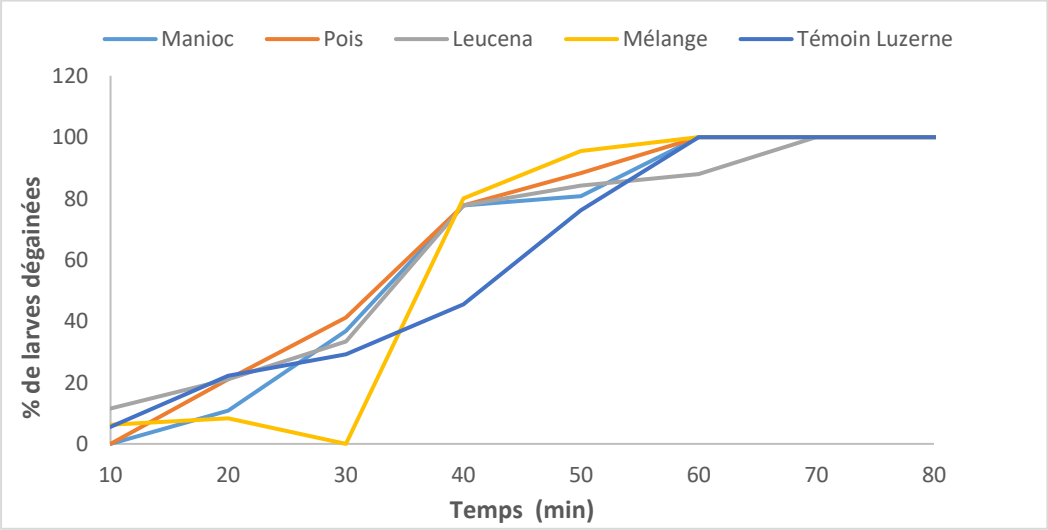


Figure II.2. % de dégainage de souches d'*Haemonchus contortus* issues d'animaux ayant ingéré des tanins condensés

II.3 Test de migration

Ce test porte sur une autre étape clé du cycle du parasite et sur la capacité des larves au stade infestant L3, à migrer. Les résultats du test sont présentés en figure II.3.

Comparativement au témoin luzerne :

Le pourcentage de migration des larves en PBS est variable d'une souche à l'autre, mais les valeurs sont moyennes et ne sont pas significativement différentes du témoin luzerne (P=1). L'ingestion des plantes par les animaux n'a donc pas d'impact sur le pouvoir de migration des larves infestantes au stadeL3.

L'action des molécules chimiques est variable. Ainsi on observe que :

Toutes les souches de nématodes sont sensibles au lévamisole (P= 1 ; par rapport au témoin luzerne). En effet, il n'y a pas de migration car les larves sont inhibées lors de la phase d'incubation dans le produit.

Les souches de nématodes sont globalement sensibles à l'ivermectine, même si on observe une sensibilité plus ou moins grande suivant la souche comparativement au témoin luzerne. Ainsi les souches issues d'animaux nourris aux : manioc, pois et mélange de plantes sont très sensibles à l'ivermectine (P=1 par rapport au témoin luzerne), alors que l'on voit une petite résistance de la souche issue d'animaux nourris au leucaena, qui est significativement différente du témoin luzerne (9.4% de migration, P=0.0662).

L'analyse de la migration des larves mises à incuber avec le thiabendazole montre des résultats plus contrastés. Tandis que les souches issues d'animaux nourris aux : manioc pois et mélange de plantes, ne sont pas significativement différentes du témoin luzerne(P=1), la souche issue d'animaux nourris avec du leucaena montre une tendance à la résistance au thiabendazole, comparativement au témoin luzerne (respectivement 10.8% et 26.8 % de migration ; P=0.1069).

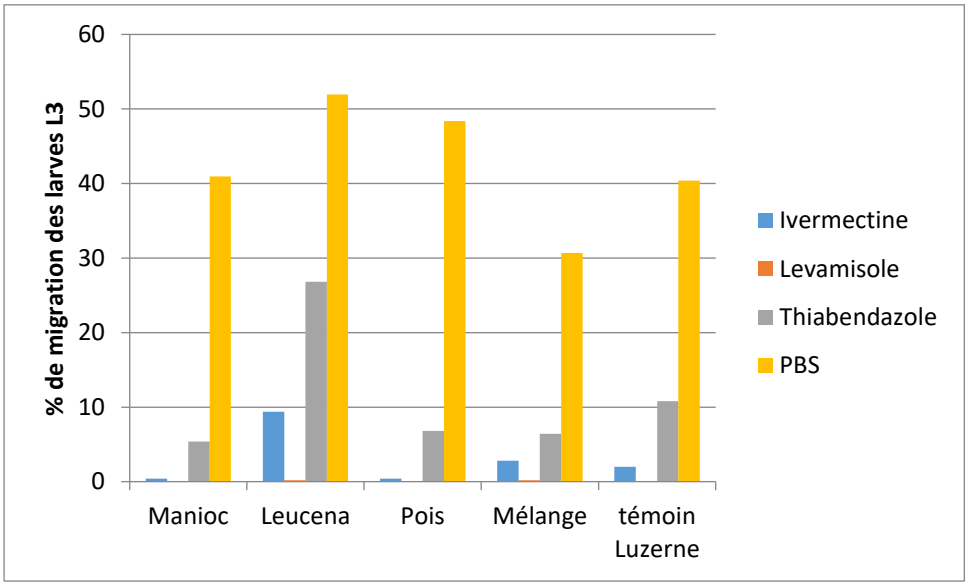


Figure II.3. Effet des molécules anthelminthiques sur la migration larvaire de souches d'*Haemonchus contortus* issues d'animaux ayant ingéré des tanins condensés.

III. Conclusion

L'objectif de l'étude était d'évaluer l'impact de traitements anthelminthiques à base de plantes à tanins condensés, sur le pouvoir infestant de souches de nématode *Haemonchus contortus* issues d'animaux infestés et nourris avec du manioc, leucaena, pois d'Angole et leur mélange.

On peut dire en conclusion que les larves issues d'animaux nourris avec des plantes à tanins gardent leur pouvoir infestant, même si des effets variables des plantes sont observés sur le cycle du parasite. En effet, l'étude a permis de mettre en évidence un effet significatif sur le développement larvaire à la deuxième génération de parasites issues d'animaux infestés et ayant ingéré du pois d'Angole. De plus, le dégainement des larves infestantes issues d'animaux infestés ayant ingéré du leucaena est significativement retardé. L'ingestion des plantes à tanins condensés par les animaux, n'a pas d'impact sur le pouvoir de migration des larves infestantes au stade L3. D'autre part, malgré une tendance à la résistance au thiabendazole observée à la première génération de larves issue d'animaux ayant ingéré du leucaena, les résultats ont montré qu'après une exposition aux tanins condensés, les souches ne développent pas de résistance aux anthelminthiques de synthèse à la deuxième génération, et ce malgré un effet positif des plantes sur l'inhibition du développement larvaire du stade L1 au stade L3, comme dans le cas du pois d'Angole.

Le retardement de dégainement, observé dans le cas du leucaena, mène à s'interroger sur une trop courte durée de l'alimentation des animaux avec les plantes à tanins condensés, pour conduire à un effet sur les larves infestantes. Il serait donc intéressant de reproduire l'expérimentation d'ingestion de plantes à tanins par des animaux infestés, en intégrant un effet temps sur le pouvoir infestant de ces larves. De plus, l'observation des différents effets des plantes à tanins sur les larves montre d'emblée que l'action des tanins condensés dépend de leur structure. Il faut rappeler que les larves sont identiques à l'origine et que la différenciation s'est faite sur l'aliment avec lequel ont été nourris les animaux. Sachant que les tanins condensés sont des molécules très complexes dont la structure peut varier dans une même famille botanique, il serait également intéressant d'étudier ces différentes structures.

Apport personnel

Ce stage m'a permis d'apporter mon aide à un projet de recherche d'une alternative à l'utilisation des traitements anthelminthiques face aux strongles gastro-intestinaux.

Après une durée de 2 mois au sein de l'INRA à l'unité URZ, ce stage m'a permis d'intégrer le monde professionnel et ainsi acquérir de la méthodologie. Cette expérience m'a permis d'avoir une conduite plus professionnelle et plus rigoureuse ainsi adopter une méthode beaucoup plus méthodique. J'ai donc pu mesurer avec ampleur le travail minutieux des techniciens ainsi que des chercheurs et ainsi adopter des réflexes nécessaires pour surmonter des éventuelles difficultés.

Références bibliographie

https://patre.reussir.fr/actualites/sante-les-parasites-de-l-ete:0P06XVKV.html

http://www.brebis-en-bretagne.fr/article-comment-faire-une-coproscopie-simple-novembre-2012-112908279.html

https://www.alliance-elevage.com/informations/article/les-strongyloses-gastro-intestinales

http://www.inn-ovin.fr/la-chronique-ovine-haemonchose-le-parasite-de-lete-des-ovins/

http://www2.vetagro-sup.fr/etu/copro/sommaire/diagnostic_par_especes/bovins/fiche_para/f_str_dig.htm

http://idele.fr/presse/publication/idelesolr/recommends/haemonchose-le-parasite-de-lete-des-ovins-et-des-caprins.html

https://www.parasite-journal.org/articles/parasite/pdf/1999/04/parasite1999064p333.pdf

https://agritrop.cirad.fr/394098/1/ID394098.pdf

https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00799960/document

https://fr.virbac.com/home/toutes-les-maladies/strongles-bovins.html

http://www.gds-poitou-charentes.fr/article/gestion-des-strongles-gastro-intestinaux-en-elevage-ovin.html

http://oatao.univ-toulouse.fr/5174/1/chretien_5174.pdf

https://www.agridea.ch/fileadmin/References/FT_Strongles_petitruminants-F.pdf

http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000299/01/lacroux.pdf

https://animaldiversity.org/accounts/Haemonchus_contortus/

https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2634&Itemid=2912

https://magasinsaveve.be/Conseils/Detail/animaux/mouton/soins-a-apporter-a-un-mouton/deceler-et-traiter-les-parasites-internes-des-moutons/40cf2

https://www.researchgate.net/publication/323243094_MANUEL_DE_CLINIQUE_DE_PATHOLOGIE_DES_PETITS_RUMINANTS

https://books.google.gp/books?id=M-eKk7LV0lkC&pg=PA143&lpg=PA143&dq=haemonchose+symptomes&source=bl&ots=60nXIyaitZ&sig=s1_wspnV20sp1ZAy5nOoMjvmtOo&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwiG-96A8YvfAhUmqlkKHe0JBGk4ChDoATAIegQIBBAB#v=onepage&q&f=false

https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/haemonchus-contortus

http://transfaire.antilles.inra.fr/IMG/pdf/traitements-cibles-2013.pdf

https://www.academie-veterinaire-defrance.org/fileadmin/user_upload/pdf/cabaretw.pdf

https://www.alliance-elevage.com/informations/article/les-strongyloses-gastro-intestinales

https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01820649/document

https://www.santemagazine.fr/medecines-alternatives/approches-naturelles/phytotherapie/phytotherapie-mode-demploi-comment-utiliser-les-plantes-pour-se-soigner-177037

https://www.universalis.fr/encyclopedie/tanins-tannins/

https://sante-medecine.journaldesfemmes.fr/contents/805-phytotherapie-principes-et-precautions

https://www.creapharma.ch/principes-actifs-phytotherapie.htm

https://www.passeportsante.net/fr/Therapies/Guide/Fiche.aspx?doc=phytotherapie_th

https://www.espritsante.com/articles/tanin

https://dico-du-vin.com/tannin-ou-tanin-polyphenols-composes-phenoliques-vinicultureviticulture/

http://www.oenoprod.com/conseil/utilisationdestaninsen-9.php

https://www.creapharma.ch/principes-actifs-phytotherapie.htm

http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/phytotherapie/niv2/principes-phytotherapie.htm