



**HAL**  
open science

# Evaluation de l'effet anthelminthique des tanins condensés issus de plantes tropicales sur le parasite *Haemonchus contortus*

Gillardot Anthony

► **To cite this version:**

Gillardot Anthony. Evaluation de l'effet anthelminthique des tanins condensés issus de plantes tropicales sur le parasite *Haemonchus contortus*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2014. hal-02961715

**HAL Id: hal-02961715**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02961715>**

Submitted on 8 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

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



MASTER EN SCIENCES, TECHNOLOGIES ET SANTE

DISCIPLINE : BIOLOGIE-SANTE

**Evaluation de l'effet anthelminthique  
des tanins condensés issus de plantes  
tropicales, sur le parasite *Haemonchus  
contortus***

Présenté par  
GILLARDOT Anthony

Responsable de stage INRA : Dr Carine MARIE-MAGDELEINE  
Responsable de stage UAG : Dr Olivier GROS

*Unité de Recherche Zootechnique de l'INRA  
Domaine de Duclos Petit-Bourg  
Mémoire soutenu en Juin 2014*

## Remerciements

C'est avec un grand plaisir que j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont participé au bon déroulement de mon stage au sein de l'Unité de Recherche Zootechnique de l'INRA au cours de ces six mois.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma responsable de stage Mme Carine Marie-Magdeleine pour sa patience, ses conseils, son soutien, sa disponibilité et surtout sa gentillesse. Carine, merci pour cette véritable expérience professionnelle et humaine, grâce à cela, j'ai pu avoir un regard interne sur le monde de la recherche.

Je remercie Mr Olivier Gros, le responsable du master pour sa disponibilité et sa patience.

J'ai apprécié l'encadrement et l'investissement du personnel de laboratoire que je remercie pour tout ce dont ils ont fait preuves à mon égard. À ce titre, je remercie Tatiana Etienne, Lucina Albinne, Suzitte Calif, Lucien Philibert et Yoann Félicité.

Je remercie sincèrement les thésards Roseline, Willy, Jouja et Muriel pour leurs précieux conseils et leur bonne humeur sans qui ce stage n'aurait pas été pareil. Roseline et Willy, je vous remercie pour tout et notamment les précieux conseils que vous m'avez délivrés.

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à la bonne marche et à l'aboutissement de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe de l'URZ, en particulier Mr Jean-Christophe Bambou et Mr Harry Archimède notamment Jean-Christophe pour tous les précieux conseils qu'ils m'ont apportés, la sympathie et la patience dont ils ont fait preuve vis-à-vis de moi.

Une pensée pour mes camarades de Master Steve, Amandine, Loïc et Lisa et ceux que j'ai rencontré au cours de ce stage Amandine 2...

Je remercie mes parents et ma famille pour leur soutien et leur encouragement.

Je remercie enfin ma filleule Bénicia et ma chère et tendre Pauline, notamment cette dernière pour la manière dont elle s'est occupée de moi pour me remettre sur pied quand le Chikungunya s'est joué de moi en cette fin de stage.

# Liste des abréviations

**TC** : Tanin condensé

**HPLC** : Chromatographie Liquide à Haute Pression

**LDA** : Test de Développement Larvaire

**LEIA** : Test d’Inhibition de Dégainement Larvaire

**PBS** : Phosphate Buffer Sample

**PEG** : Polyéthylène Glycol

**PVPP** : Polyvinylpolypyrrolidone

**PC** : Procyanidine

**PD** : Prodelphinidine

***H.contortus*** : *Haemonchus contortus*

**T<sub>R</sub>** : Temps de rétention

**SGI**: Strongle gastro-intestinal

**SEM**: Standard Error of Mean

# Table des matières

<b>Remerciements .....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>2</b>
<b>I- Introduction.....</b>	<b>5</b>
1- Contexte général.....	5
2- Synthèse bibliographique .....	6
Parasite et hôte .....	6
Les anthelminthiques nématocides chimiques.....	7
Alternatives aux anthelminthiques chimiques .....	8
La phytothérapie .....	8
Les tanins .....	9
Choix des plantes .....	10
<i>Manihot esculenta</i> (Manioc) .....	10
<i>Leucaena Leucocephala</i> (Leucaena).....	11
<i>Cajanus cajan</i> (Pois d'angole) .....	12
Choix des tests <i>in vitro</i> .....	12
<b>II- Matériels et méthodes .....</b>	<b>14</b>
Matériels .....	14
1- Matériel Biologique .....	14
2- Matériels végétales : Tanins condensés.....	14
Méthodes .....	15
1- Tests Anthelminthiques <i>in vitro</i> .....	15
1.1- Test de développement larvaire (Larval development Assay, LDA).....	15
1.2- Test de dégainement (Larval Exsheathment Assay) .....	16
2- Analyse Chromatographie Liquide à Haute pression (HPLC) .....	17

3- Analyses Statistiques .....	17
<b>III- Résultats .....</b>	<b>18</b>
1- Tests anthelminthiques <i>in vitro</i> .....	18
Test de développement larvaire (LDA) .....	18
Test de dégagement larvaire (LEA).....	22
2- Chromatographie Liquide à Haute pression (HPLC).....	27
<b>IV- Discussion.....</b>	<b>30</b>
<b>V- Conclusion et Perspectives .....</b>	<b>34</b>

# I- Introduction

## 1- Contexte général

La production ovine est en nette augmentation dans le monde entier (Veríssimo et al., 2012). Néanmoins, les nématodes parasites gastro-intestinaux, aussi appelés strongles digestifs ou strongles gastro-intestinaux (SGI) (tout particulièrement *Haemonchus contortus*) sont une menace majeure pour la santé et le bien-être de l'élevage des petits ruminants au pâturage (Azando et al., 2011). En effet, ces nématodes sont à l'origine d'une baisse importante des performances des élevages. De plus, dans les régions tropicales, les conditions environnementales favorisent le développement des strongles hématophages hautement pathogènes comme *Haemonchus contortus* (Marie-Magdeleine et al., 2010).

Depuis plus de 50 ans, le principal traitement de ces parasites est basé sur l'utilisation répétée d'anthelminthiques chimiques. Cependant, cette dépendance aux vermifuges de synthèse se heurte à plusieurs limites. En effet, depuis une vingtaine d'années, un problème de résistance aux anthelminthiques chimiques dans les populations de nématodes parasites du monde entier est apparu (Hoste et al., 2012). Au cours de ces dernières années un usage excessif et considérable de ces vermifuges (Moreno-Gonzalo et al., 2013), a conduit à l'apparition croissante de souches de parasites résistantes aux vermifuges de synthèse. Dans de nombreuses régions du monde, il n'est plus rare de trouver des ovins et des caprins où la résistance existe vis-à-vis d'une (mono-résistant) voire plusieurs (multi-résistant) molécules, (Da Cruz et al., 2010). 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). Ainsi, l'apparition, le développement de ces résistances et les différentes pressions des consommateurs amènent à se poser la question sur une réduction de l'utilisation de substances chimiques dans le secteur de l'élevage et à inciter une recherche active de solutions alternatives ou complémentaires à la chimiothérapie pour le contrôle du parasitisme gastro-intestinal (Hoste and Torres-Acosta, 2011).

La phytothérapie, en particulier avec des extraits de plantes riches en métabolites secondaires notamment en tanins condensés (TC), a été proposée comme une alternative durable pour le contrôle des nématodes gastro-intestinaux (Hoste et al., 2006). Le rôle des TC dans de nombreux processus biologiques liés à différents stades de nématodes ont été confirmé

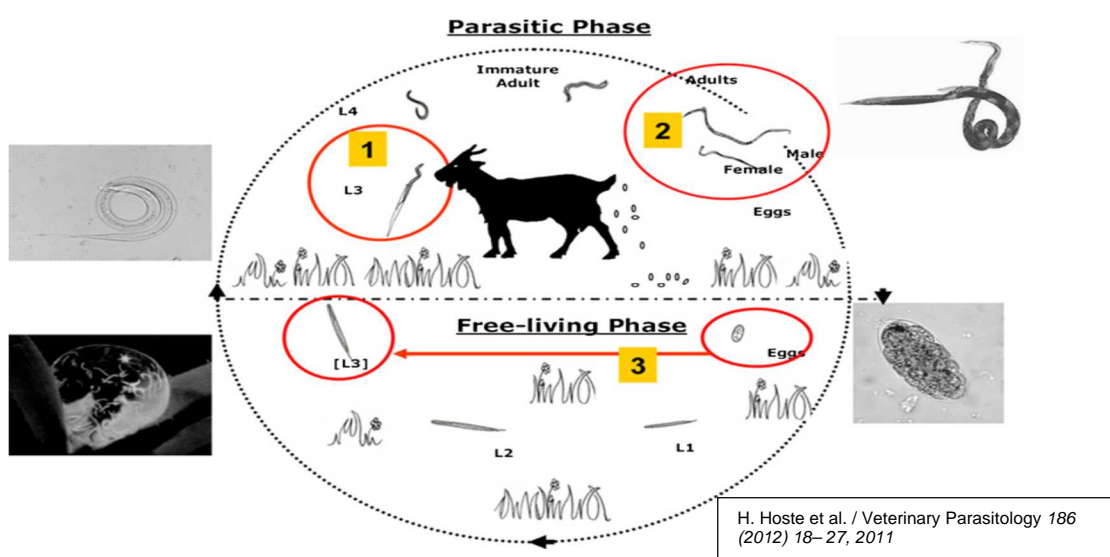
par des études *in vitro* (Hounzangbe-Adote et al., 2005). Les mécanismes par lesquels les TC neutralisent les parasites peuvent varier, en fonction de la nature et de la composition des différentes espèces fourragères (Brunet et al., 2008b).

L'utilisation possible des plantes à TC a été l'objet de plusieurs études. Les premiers résultats obtenus en Nouvelle-Zélande ont suggéré que la consommation de plantes riches en TC peut affecter la biologie des différentes espèces de strongles et que les TC pourraient être responsables de ces effets (Paolini et al., 2003);(Niezen et al., 2002). 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 anthelminthiques (Brunet et al., 2008a; Marie-Magdeleine et al., 2010; Min et al., 2005) alors que d'autres n'ont pas d'activités anthelminthiques (Pomroy and Adlington, 2006).

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer *in vitro* les effets inhibiteurs de tanins condensés issus de trois plantes différentes, sur le processus de dégainement de la larve de stade L3 (infestante) et sur le développement larvaire du parasite *H. contortus* afin d'étudier le mode d'action de ces tanins sur le parasite *H. contortus*.

## 2- Synthèse bibliographique

### Parasite et hôte



**Figure 1.** Cycle du parasite gastro-intestinal *Haemonchus contortus*



La femelle localisée dans la caillette de l'animal pond quotidiennement 5 000 à 10 000 œufs. Ceux-ci passent du tractus digestif au milieu extérieur *via* les fèces de l'hôte. Une fois dans le milieu environnant et dans des conditions optimales de températures (24 à 29°C), des larves dites au stade L1 sortent des œufs. Quatre à six jours s'écoulent entre l'émission des œufs et ce stade. Près de 24 à 48 heures après l'apparition du stade L1, une première mue a lieu et les larves deviennent des larves L2. Les deux stades juvéniles se nourrissent exclusivement de bactéries présentes dans le fumier. Deux à quatre jours après, des larves infestantes L3 apparaissent suite à une nouvelle mue. Elles migrent vers le sommet des brins d'herbe et attendent d'être ingérées par les animaux. Ces larves possèdent une gaine protectrice qui, premièrement, leur permet de survivre dans le milieu et, deuxièmement, les protégera lors de leur passage dans le tractus digestif. Dans l'attente, elles ne vivent que de leurs réserves lipidiques. Une fois avalées, les larves L3 transitent dans le tube digestif jusqu'à la caillette. Pendant leur migration, elles perdent leur gaine protectrice et se logent dans la muqueuse. L'accumulation des larves dans l'estomac modifie la pression partielle de CO<sub>2</sub> et élève la température du milieu. Les modifications dans l'environnement digestif induisent le développement, 48 heures après, des larves L3 en larves L4 hématophages. Elles ont perdu leurs gaines (processus de dégainement) mais ont acquis une dent vestigiale perforante qui leur permet d'atteindre la lumière des capillaires sanguins de la muqueuse et de se nourrir. Au cours des quatre à six jours suivants, la larve L4 évolue en larve juvénile au stade L5 et une semaine après, les adultes sexués apparaissent. Tous les individus hématophages se nourrissent jusqu'à 0,05ml de sang par jour. Trois semaines s'écoulent entre l'infestation de l'animal et l'apparition des premiers œufs dans les fèces : période pré-patente (Sendow, 2003).

### Les anthelminthiques nématocides chimiques

Les nématocides actuels appartiennent actuellement 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 est constitué de benzimidazoles et probenzimidazoles et se caractérise par leur liaison sur la tubuline du parasite.

- Le groupe 2 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 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 est composé de nématocides à spectre étroit (actif vis-à-vis des vers hématophages tel *H. contortus*, c'est-à-dire nitroxynil, closantel, rafoxanide, qui agissent comme découplant de la phosphorylation oxydative, conduisant à l'épuisement énergétique.

## Alternatives aux anthelminthiques chimiques

Plusieurs alternatives aux anthelminthiques chimiques contre les (SGI) ont été mises au point et agissent différemment :

- En éliminant les SGI installés dans l'animal : utilisation raisonnée des anthelminthiques, la phytothérapie.
- En stimulant la résistance et/ou la résilience de l'hôte : la sélection génétique, la vaccination, la supplémentation alimentaire et la phytothérapie.
- En minimisant la contamination du pâturage : la lutte biologique, gestion des pâturages, utilisation raisonnée des anthelminthiques chimiques et la phytothérapie.

Ces différents moyens de luttés contre les SGI ont leurs avantages mais aussi leurs inconvénients. La phytothérapie faisant partie intégrante de l'objet d'étude sera explicitée.

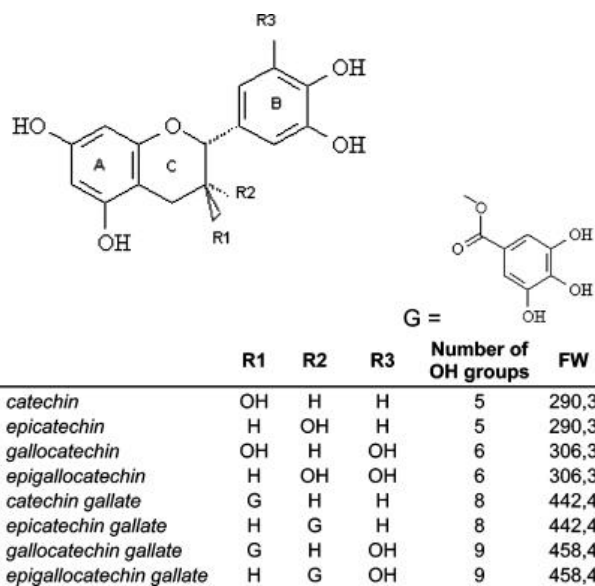
## La phytothérapie

Les plantes ou leurs extraits, sont utilisées depuis des siècles en médecine vétérinaire aussi bien en usage externe qu'en usage interne contre tous types de pathologie. En effet, les plantes contiennent de nombreuses molécules organiques telles les glucides, acides, lipides et apparentés, substances peptidiques, saponosides, alcaloïdes, polyphénols, terpènes, stéroïdes, vitamines et minéraux. Ces métabolites sont nécessaires au fonctionnement de la plante et à sa relation avec le milieu extérieur. Parmi eux, les métabolites secondaires : les saponosides, les alcaloïdes, polyphénols, terpènes, stéroïdes, acides aminés non protéiques, glucosides cyanogènes et autre hétérosides. Comme leur dénomination l'indique, ces composés ne sont pas *sensu stricto* indispensables aux fonctions principales de la plante.

Les métabolites secondaires sont associés à la défense de la plante contre les insectes, les micro-organismes y compris les bactéries, les champignons et les virus, la défense contre d'autres plantes en compétition pour les nutriments et la lumière, la protection contre l'effet néfaste des ultraviolets. Ils ont aussi un rôle nutritionnel, en particulier ceux contenant de l'azote, au cours de la germination de la graine. De nombreuses structures ont été façonnées pour interagir avec de multiples cibles moléculaires et cellulaires, y compris les enzymes, les récepteurs transmembranaires transporteurs, ce qui permet donc une réponse spécifique à la cible moléculaire. Parmi, ces métabolites secondaires, un type de composés phénoliques constitue l'objet d'étude de ce mémoire : les tanins plus précisément les tanins condensés.

### Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques hydrosolubles de structure variée, caractérisés par de propriétés astringentes internes et externes. La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées à leur pouvoir de complexation avec les macromolécules, en particulier les protéines. Certains possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques et hypoglycémiantes. Ce sont d'excellents antidiarrhéiques, protecteurs veineux et sont également hémostatiques, antioxydants et peuvent être des inhibiteurs enzymatiques (Bruneton, 1999). Leur capacité de complexation avec des macromolécules telles les protéines, l'amidon, les fibres sont responsables de la plupart de leurs actions biologiques. Il existe deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (TC). Les tanins hydrolysables sont des polyesters d'un sucre avec des molécules d'acides phénols, certains ont un effet antimutagène mais sont toxiques vis-à-vis des ruminants (Paolini, 2004). Cette toxicité est due au fait qu'ils peuvent être dégradés en acides galliques et absorbés facilement dans le tube digestif. Les TC appelés aussi proanthocyanidols sont des polymères de flavan-3-ol issus du métabolisme des flavonoïdes avec une large gamme de variations structurales en fonction des unités monomères flavan-3-ol et du degré de polymérisation (**Fig.2**) répartis en deux groupes les procyanidines (PC) composés des catéchines et de l'épicatéchine avec leur homologue gallate et les prodelphinidines (PD) constitués des gallocatéchines et des épigallocatéchines avec leur homologues gallates.



**Figure 2.** Structure chimique des monomères de TC flavan-3-ols and flavan-3-ol gallates

En

outre, une consommation de concentration élevée de TC (< 7% de matière sèche (MS)) est associée un certain nombre d'effets néfastes sur les ruminants tels la réduction de la prise alimentaire, une interférence avec la morphologie et l'activité protéolytique des microbes dans le rumen. Cependant, une consommation de concentrations faibles ou modérées de TC (> 6% MS) ont eu des effets positifs sur les herbivores par exemple sur l'augmentation de la croissance, de la production de lait et de laine (Hoste et al., 2006; Min et al., 2003). En général, les effets bénéfiques observés suite à la consommation de tanins condensés sont principalement dus à leur capacité de liaison aux protéines, ce qui protège les protéines alimentaires de la dégradation dans le rumen et donc augmente la disponibilité de ces protéines dans le tractus digestif inférieur (Hoste et al., 2006; Min et al., 2003).

## Choix des plantes

Chacune de ces plantes a été choisie pour diverses raisons telles leur distribution sur le territoire, leur teneur en métabolites secondaires notamment en tanins et leurs propriétés médicinales.

### *Manihot esculenta* (Manioc)

*Manihot esculenta* (Français : Manioc, Anglais : Cassava) appartient à la famille des *Euphorbiaceae*. La culture de manioc dans le monde est d'environ 250 millions de tonnes par années. Le manioc est la 4<sup>e</sup> plante alimentaire derrière le maïs, le blé et le riz dans les pays en développement. Cette plante se cultive



<http://fr.wikipedia.org/wiki/Manioc>

facilement par bouturage, résiste naturellement à la sécheresse et est capable de s'accommoder à des fortes augmentations de température et des concentrations en CO<sub>2</sub> atmosphérique (Laurent, 2013). Cependant, toutes les parties de la plante contiennent deux glucosides cyanogènes (HCN), la linamarine et la lautostraline étant bien évidemment toxiques. En fonction de leurs teneurs en glucosides cyanogènes, le manioc se déclinera en plusieurs variétés classées selon leur toxicité, les moins toxiques feront parties du type manioc doux et les plus toxiques du type manioc amère. En fonction de ses variétés, la plante pourrait contenir des quantités variables d'acétone, d'acide oxalique, de saponine, de tryptophane. La feuille de manioc contient de la quercétine libre, un flavonoïde anti-hémorragique, anti-oxydant, anti-inflammatoire, et veinotonique (TRAMIL, 1999) ; mais aussi de la vitamine C, des glucosides flavoniques mais surtout des tanins condensés (Tien Dung et al., 2005).

### *Leucaena Leucocephala* (Leucaena)

*Leucaena Leucocephala* a été connue sous le nom aussi d' « arbre miracle » en raison de son succès dans le monde entier dû au fait que c'est un arbre fourrager à long terme et à grande valeur nutritif notamment des protéines, des fibres, de nombreux acides aminés et des tanins. Mise à part sa valeur fourragère, il peut fournir du



bois, du bois de chauffage, être utilisé comme engrais vert, fournir de l'ombre et contrôler l'érosion. De plus, cette plante est connue pour sa grande capacité à fixer l'azote ce qui lui permet de résister aux climats difficiles. Il est estimé que *Leucaena Leucocephala* couvre 2,5 millions d'hectares à travers le monde. Toutefois, une meilleure connaissance de ses contraintes nous apporte une vision plus équilibrée de cette plante (Shelton and Brewbaker, 1998). En effet, les feuillages de *Leucaena* contiennent un acide aminé toxique : la mimosine qui peut atteindre jusqu'à 12% dans la matière sèche et 3-5% dans la matière sèche des jeunes feuilles. Très toxiques pour les non-ruminants, il est décomposé dans le rumen des ruminants par la flore microbienne en composants atoxiques. Par ailleurs, la feuille de *leucaena* est une source importante de tanins (10,15 mg/g) d'où le choix de celle-ci (Shelton and Brewbaker, 1998). *Leucaena leucocephala* est utilisée à des fins diverses en médecine et en industrie pharmaceutique. En médecine traditionnelle, il a été rapporté que la plante entière peut être utilisée pour traiter des troubles oculaires et de la blennorragie (Arbonnier, 2002).

### *Cajanus cajan* (Pois d'angole)

*Cajanus cajan* (Français: Pois d'angole, Sanskrit: Adhaki, Hindi: Arhar, Anglais: Pigeon pea, Bengali: Tur) appartient à la famille des *Fabaceae*. La culture du pois d'angole est la plus importante en termes d'agriculture de légumineuses à grains en zone tropicale semi-aride (Pal et al., 2011). À la fois culture vivrière et fourragère, le pois d'angole contient une grande quantité de protéines et d'acides aminés importants tels la méthionine, la lysine et le tryptophane.



Roy Winkelman, 2013

Des recherches chimiques ont montré que la feuille de pois d'angole est riche en flavonoïdes et stilbènes. Ils contiennent également des saponines, une quantité remarquable de tanins et des quantités modérées de sucres réducteurs, les résines et les terpènes (Pal et al., 2011).

En dehors de son utilisation folklorique, les études scientifiques modernes sur le pois d'angole viennent confirmer différentes activités biologiques et pharmacologiques.

- Une activité anti-microbienne (Zu et al., 2010)
- Une activité anti-bactérienne (Kong et al., 2010)
- Un effet hypocholestérolemique (Luo et al., 2008)
- Un effet anti-diabétique (Ezike et al., 2010)
- Des propriétés neuro-actives (Nicholson et al., 2010)
- Une activité anti-oxydante (Wu et al., 2009)
- Une activité anti-cancéreuse (Luo et al., 2010)
- Une activité hépato-protectrice (Rizk et al., 2014)
- Une activité anthelminthique (Siddhartha et al., 2009)

### Choix des tests *in vitro*

Deux types de tests *in vitro* ont été réalisés : le premier évaluant le développement larvaire du stade L1 à L3, en effet, les TC étant très peu digestibles, ils se retrouvent dans les fèces et donc pourraient empêcher le développement des larves L1-L2 vers le stade infestant L3, réduisant ainsi la pression parasitaire au pâturage ; le second, évaluant le dégainement des larves L3. En effet, les larves de troisième stade (L3 qui sont infestantes) qui sont responsables de la rapide infestation de l'hôte, subissent des changements fonctionnels et structurels induits par

les TC (Hoste et al., 2012). Le succès de l'infestation de l'hôte par les L3 dépend de deux processus successifs :

- **Dégainement** : Sur les pâturages, les larves infestantes sont enfermées dans une gaine, qui leur assure une résistance aux conditions extérieures changeantes essentiellement le froid, la chaleur et la dessiccation. Après ingestion par le mouton ou la chèvre, le dégainement larvaire est le premier stade d'invasion chez l'hôte. Ce procédé permet la transition entre l'extérieur et les phases internes du cycle de vie (Fig. 1). Il se produit dans l'organe digestif précédant celui habité par les vers adultes, c'est-à-dire dans le rumen, dans la caillette pour les petites espèces (Hertzberg et al., 2002). Ce phénomène de dégainement est contrôlé par un facteur temps et donc, doit se produire dans les quelques heures suivant l'ingestion de larves. Sinon, le succès de l'infestation des larves est gravement compromis (DeRosa et al., 2005; Hertzberg et al., 2002)

**La pénétration des larves dans la muqueuse digestive** : Après dégainement, les larves migrent à l'organe habité par les vers adultes. Ils pénètrent alors la muqueuse digestive avant la mue pour devenir la larve L4 (larve stade 4) (voir Fig. 1).

## II- Matériels et méthodes

### Matériels

#### 1- Matériel Biologique

Afin d'obtenir le matériel biologique nécessaire aux essais *in vitro*, 6 moutons de race Martinik, de phénotype Black Belly ont été infestés expérimentalement par 3 souches du parasite *H.contortus*, à raison de 2 animaux par souche.

Les trois souches de *H.contortus* utilisées sont :

- Souche non-résistante aux anthelminthiques chimiques ou souche « sensible », en provenance de l'INRA Antilles-Guyane site de Gardel.
- Souche mono-résistante aux anthelminthiques chimiques. Cette souche est résistante aux benzimidazoles, en provenance d'un élevage de petits ruminants de Guadeloupe.
- Souche multi-résistante aux anthelminthiques chimiques. Cette souche est résistante aux avermectines et aux benzimidazoles et provient d'un élevage de petits ruminants de Guadeloupe.

Chacun des moutons a reçu *per os*, 10 000 larves infestantes L3, sous forme de suspension dans l'eau.

Les fèces des animaux ont été recueillies 21 jours post-infestation. Une partie est mise en culture afin de produire les larves de stade L3 (coproculture). Une autre partie des fèces est traitée afin d'en extraire les œufs.

#### 2- Matériels végétales : Tanins condensés

Les TC purs utilisés pour les tests *in vitro* ont été préparés par le laboratoire de l'URZ, à partir des 3 plantes : feuilles de manioc, feuille de *leucaena* et feuilles de pois d'angole préalablement lyophilisées. La poudre de plante est dépigmentée puis extraite à l'acétone 70% dans l'acide ascorbique. L'extrait brut est ensuite purifié sur gel de Sephadex LH20 afin d'obtenir les TC.



## Méthodes

### 1- Tests Anthelminthiques in vitro

#### 1.1- Test de développement larvaire (Larval development Assay, LDA)

Le Test de développement larvaire a pour objectif de tester l'efficacité de tanins condensés purifiés, à inhiber le développement larvaire du stade L1 au stade infestant L3, sur des souches d'*H. contortus* de résistance différente.

Le test utilisé est une modification (Assis et al., 2003) de la technique décrite par (Hubert and Kerboeuf, 1992)

Les œufs sont extraits après broyage des fèces et différents tamisages successifs (tamis de 500, 250, 125, 63 et 32 $\mu$ m) puis centrifugés pendant dix minutes à 2000 tours/min. Le surnageant est éliminé et une solution de NaCl saturé de densité 1,2 est rajoutée. L'ensemble est à nouveau centrifugé durant 15 minutes à 3000 tours/min. Un anneau d'œufs se forme en surface et est ensuite récupéré sur un tamis de 32 $\mu$ m puis rincer abondamment à l'eau distillée puis stérile. La suspension d'œufs est distribuée dans des boîtes de 24 puits à raison de 0,5 mL de solution d'œufs à 400 œufs / mL par puits. La même opération est répétée pour les trois souches. Ces œufs sont mis en culture à température ambiante pendant 48h qui est le temps nécessaires à l'éclosion des œufs. À 24h de culture, 30 $\mu$ l de milieu nutritif, Earle est rajouté dans chaque puits et à 48h de mis en culture, 40  $\mu$ l est rajouté (pour une boîte de 24 puits : 0,01g d'extrait de levure, 1,5 mL d'eau stérile, 0,17 mL solution Earle stabilisé à pH : 7,2 à l'aide d'une solution de soude NaHCO<sub>3</sub> à 50 g/L). 0,5 mL de TC dissout dans du PBS aux concentrations 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 mg/mL, 0,5 mL de témoins positifs albendazole et ivermectine (dilué dans du DMSO 3% puis dans du PBS pour obtenir au final une concentration de 10 mg/mL) et 0,5 mL de PBS qui constituera notre témoin négatif sont ajoutées aux puits. Cinq répétitions ont été exécutées pour chaque dose de TC et pour chaque contrôle positif. Huit répétitions pour le contrôle négatif PBS.

Les concentrations finales testées en TC sont les suivantes : 2.5, 1.25, 0.5, 0.25 et 0.05 mg/mL ; des témoins positifs albendazole et ivermectine sont de 5 mg/mL. Les larves ont été incubées pendant huit jours à température ambiante (25 ° C), afin de permettre le développement des larves de la première phase (L1) à la troisième phase (L3). Par la suite, 20 $\mu$ l de solution de Lugol iodine ont été ajoutés à chaque puits et le nombre de larves a été

dénombré en utilisant un microscope grossissement x30 en distinguant les larves infestantes L3 des larves L1-L2. Le pourcentage de développement a été calculé comme suit : nombre de larves L3 par puits / total L1-L2-L3.

### 1.2- Test de dégainement (Larval Exsheathment Assay)

Le test de dégainement a pour objectif de tester l'effet des TC sur le dégainement des larves L3 de *Haemonchus contortus*.

Les larves L3 ont été récupérées par coproculture. Les mêmes lots âgés de 2-4 mois ont été utilisés pour tous les tests de dégainement.

Le test est une modification de la technique décrite par (Bahuaud et al., 2006)

#### Mise au point du test de dégainement

Cette étape aura pour but de définir la concentration de solution hypochlorite la plus adéquate à utiliser pour le test. La concentration de solution hypochlorite devra permettre un dégainement total des larves (100%) à T50 minutes-T60 minutes. Cette mise au point sera reconduite pour chaque souche de *Haemonchus contortus*.

Une solution larvaire à 2000 L3/mL a été soumise au processus artificiel de dégainement par mise en contact avec une solution de NaCl 16,6% et d'eau de Javel à 2,6 de Chlore Actif dilué aux concentrations 1/40, 1/50, 1/60, 1/70. Pour ce faire, distribuer 750 µL de chaque dose dans un tube cristal bien identifié puis ajouter sous agitation 750 µL de solution larvaire à 2000 larves L3/mL. Dans le dernier tube, ajouter 750 µL de PBS et 750 µL de solution larvaire à 2000 L3/mL.

Prélever toutes les 10 min durant 60 min (ayant comme point de départ 0min), 200 µL dans chaque tube cristal après avoir homogénéisé la suspension. Les transférer dans un tube Eppendorf de 1,5 ml identifié, dans lequel 20 µL de Lugol concentré aura été préalablement distribué.

#### Test de dégainement

2000 L3 gainés ont d'abord été incubés 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 ; phosphate 0,1 M, NaCl 0,05 M). L'utilisation de PBS visant à éviter les interférences avec un effet non spécifique dû au changement de pH. 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 défini lors de la mise au point. La cinétique de dégainement est mesurée sous observation microscopique à un grossissement de 40, en prélevant toutes les dix minutes, jusqu'à 60 minutes, 200 µl dans un tube Eppendorf de 1,5 ml dans lequel 20µl de Lugol a été distribué préalablement. Pour chaque dose d'un même tanin condensé, six répétitions ont été exécutées. En plus des TC testés, un contrôle négatif (L3 dans PBS) a été exécuté en parallèle.

## 2- Analyse Chromatographie Liquide à Haute pression (HPLC)

Afin de réaliser une étude comparative des TC d'un point de vue qualitatif, une analyse HPLC avec étalon interne a été réalisée.

Les TC purifiés sont passés sous chaîne HPLC, sous les conditions suivantes :

- Concentration : 1mg/mL (TC)
- Concentration étalon acide benzoïque 0.2mg/mL
- Phase mobile : 70% eau, 28% Acétonitrile, 2% acide acétique
- Phase stationnaire : phase inverse

Les profils obtenus sont comparés selon 2 critères : leur absorbance maximale  $\lambda_{\max}$  et la différence  $\Delta TR$  de temps de rétention par rapport à l'étalon interne, calculée pour chaque composé retenu, selon la formule:

$$\Delta TR = TR \text{ acide benzoïque} - TR \text{ Composé}$$

Les composés montrant une même  $\lambda_{\max}$  (arrondie à la dizaine supérieure) et un même  $\Delta TR$  (au dixième près) seront considérés comme potentiellement identiques.

## 3- Analyses Statistiques

Les données des tests de dégainement et LDA ont été analysées en utilisant Graphpad Prism 6 software : Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée et les comparaisons des moyennes est faite en utilisant la méthode de Bonferroni. La dose requise pour inhiber à 50% le dégainement des larves et inhiber à 50% le développement larvaire (IC 50) a été calculée.

## III- Résultats

### 1- Tests anthelminthiques *in vitro*

#### Test de développement larvaire (LDA)

Les tests LDA ont posés de nombreux problèmes. Les tests sont considérés comme bons quand les témoins négatifs PBS ont une valeur approximative du développement larvaire autour de 80-100%. Il a été constaté que les boîtes de culture étaient infestées de champignons ce qui empêchait le développement larvaire. Quand les tests étaient soumis aux champignons, aucun développement larvaire n'était observé pour tous les puits, notamment pour les témoins négatifs PBS qui normalement devraient montrer un développement des larves L1 en L3 ce qui devrait attester le bon fonctionnement du test. De ce fait, les tests concernant l'effet TC *leucaena* sur la souche mono-résistante, le TC de pois d'angole sur la souche multi-résistante et le témoin positif ivermectine sur la souche multi-résistante n'ont pas fonctionnés malgré toutes les précautions prises pour limiter les contaminations extérieures et le fait que ces tests ont été refaits deux fois. Les résultats du test LDA sont présentés dans les tableaux 1, 2 et 3, et les figures 3, 4 et 5.

Traitement	% développement larvaire	P value/albendazole	P value/ Ivermectine	P value/ PBS
Ivermectine	0,3498 (±0,1743)	> 0,9999	-	< 0,0001
Albendazole	2,599(±0,4749)	-	> 0,9999	< 0,0001
PBS	81,54(±1,870)	< 0,0001	< 0,0001	-
Manioc	13,35 (±7,974)	0,1822	0,034	< 0,0001
Leucaena	11,93 (±9,685)	0,1913	0,0359	< 0,0001
Pois d'angole	3,787 (±3,787)	> 0,9999	> 0,9999	< 0,0001

**Tableau 1** : Effet des tanins condensés sur le développement larvaire de la souche non-résistante comparés au témoin négatif PBS et aux témoins positifs albendazole et ivermectine.

Traitement	% développement larvaire	P value/albendazole	P value/ Ivermectine	P value/ PBS
Ivermectine	0	0,0028	-	< 0,0001
Albendazole	22,64(±6,398)	-	0,004	< 0,0001
PBS	82,90(±2,708)	< 0,0001	< 0,0001	-
Manioc	10,55(±9,926)	0,035	> 0,9999	< 0,0001
Leucaena	x	x	x	x
Pois d'angole	5,755 (±2,787)	0,0009	> 0,9999	< 0,0001

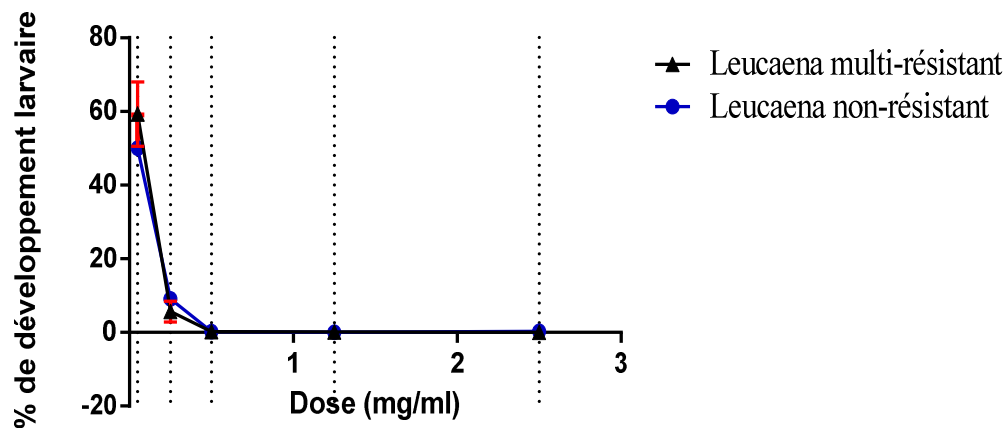
**Tableau 2** : Effet des tanins condensés sur le développement larvaire de la souche mono-résistante comparés au témoin négatif PBS et aux témoins positifs albendazole et ivermectine

Traitement	% développement larvaire	P value/albendazole	P value/ Ivermectine	P value/ PBS
Ivermectine	x	x	-	x
Albendazole	26,42(±) 3,856	-	x	< 0,0001
PBS	85,58 (±) 1,779	< 0,0001	x	-
Manioc	10,73 (±) 9,375	0,0011	x	< 0,0001
Leucaena	13,06 (±) 11,60	0,0073	x	< 0,0001
Pois d'angole	x	x	x	x

**Tableau 3** : Effet des tanins condensés sur le développement larvaire de la souche multi-résistante comparés au témoin négatif PBS et aux témoins positifs albendazole et ivermectine.

Le taux moyen de développement larvaire pour le témoin négatif PBS est de 81,54% (±1,870) pour la souche non-résistante, 82,90% (±2,708) pour la souche mono-résistante et de 85,58% (±1,779) pour la souche multi-résistante (tableaux 1, 2 et 3). Les témoins positifs des trois souches sont significativement différents des témoins négatifs PBS ( $P < 0,0001$ ). De plus, la comparaison des % de développement larvaires des témoins positifs albendazole montre une différence significative entre les souches résistantes et la souche non résistante ( $P = 0,0015$  pour la souche monorésistante et  $P < 0,0001$  pour la souche multi-résistante), et aucune différence significative entre les témoins positifs albendazole ( $P > 0,9999$ ).

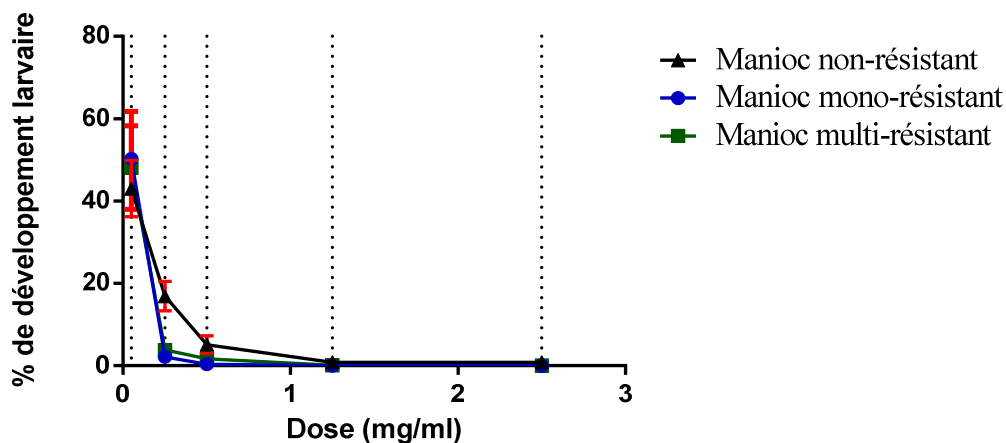
La résistance des souches *in vitro* reste cependant modérée pour les souches multi et mono résistantes évaluées (respectivement 26% et 23% de développement observé).



**Figure 3.** Effet des différentes doses de tanins condensés de leucaena sur le développement larvaire de différentes souches de *H. contortus*. Chaque point représente la moyenne (± S.E.M) de 5 répétitions par dose pour les deux souches.

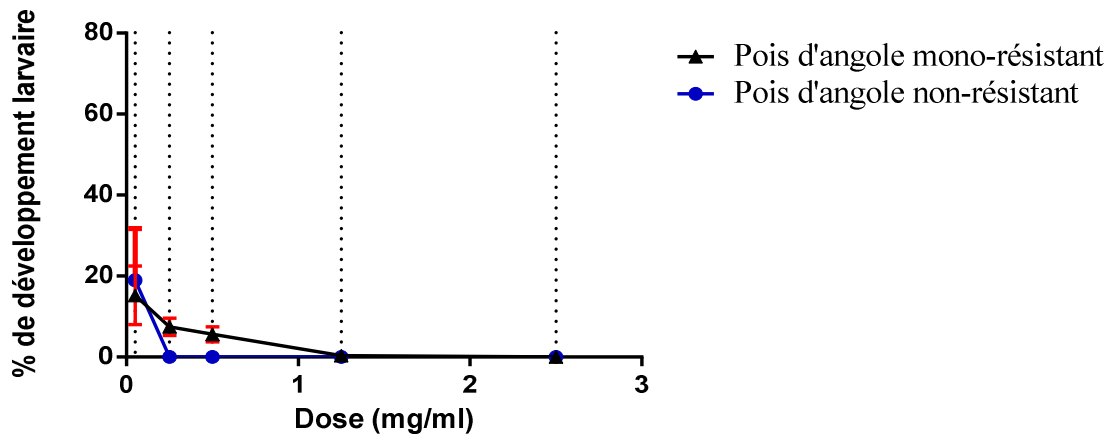
Le TC *leucaena* montre un effet significatif par rapport au témoin négatif PBS ( $P < 0,0001$ ) quelle que soit la souche d'*H. contortus* (tableaux 1, 2 et 3). Aucune différence

significative n'est observée entre souches d'*H.contortus* ( $P = 0,6709$ ). Un effet dose très significatif (Fig.3) est observé ( $P < 0,0001$ ). Le TC de *leucaena* a un effet significativement différent de l'albendazole pour la souche multi-résistante ( $P = 0,05$ ), tandis qu'il n'y a pas de différence significative avec l'albendazole sur la souche non-résistante. Concernant l'ivermectine, une différence significative est observée avec le TC de *leucaena* pour la souche non-résistante.



**Figure 4.** Effet des différentes doses de tanins condensés de manioc sur différentes souche de *H.contortus*. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  S.E.M) de 5 répétitions par dose pour les trois souches.

Le TC manioc montre un effet significatif par rapport au témoin négatif PBS ( $P < 0,0001$ ) quelle que soit la souche d'*H.contortus* (tableaux 1, 2 et 3). Un effet dose significatif (Fig.4) est observé ( $P < 0,0001$ ), et pas de différence significative entre souches ( $P = 0,5484$ ). Le TC de manioc a un effet significativement différent de celui de l'albendazole sur les deux souches résistantes testées ( $P = 0,05$ ), alors qu'il n'est pas significativement différent de l'albendazole sur la souche non résistante ( $P = 0,05$ ). Concernant l'ivermectine, (tableaux 1 et 2), aucune différence significative n'est observée avec les TC de manioc pour la souche mono-résistante ( $P > 0,9999$ ), alors qu'une différence significative est observée pour la souche non-résistante ( $P = 0,05$ ).



**Figure 5.** Effet des différentes doses de tanins condensés de pois d'angole sur différentes souches de *H. contortus*. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  S.E.M) de 5 répétitions par dose pour les deux souches.

Le TC pois d'angole montre un effet significatif par rapport au témoin négatif PBS ( $P < 0,0001$ ) quelle que soit la souche d'*H. contortus* (tableaux 1, 2 et 3). Un effet dose (Fig.5) est observé ( $P = 0,0046$ ), et aucune différence significative n'est observée entre les souches ( $P = 0,5162$ ). Le TC de pois d'angole a un effet significativement différent sur la souche mono résistante ( $P < 0,0001$ ), alors qu'il n'y a pas de différence avec l'albendazole sur la souche non résistante ( $P > 0,9999$ ). Concernant l'ivermectine, (tableaux 1 et 2), aucune différence significative n'est observée avec les TC de pois d'angole pour la souche mono-résistante, tandis qu'une différence significative est observée sur la souche non résistante.

L'analyse de variance montre donc un effet dose dépendant des TC pour la gamme de concentrations testées ( $P < 0,0001$ ). La concentration inhibitrice de 50 % de développement larvaire (IC 50) calculée ne diffère pas entre souches. Elle est de 51,11  $\mu\text{g/ml}$  pour les TC de manioc et de leucaena ( $P = 0,1357$ ), et de 9,760  $\mu\text{g/mL}$  pour les TC de pois d'angole.

En résumé, les effets des TC sur le développement larvaire d'*H. contortus* sont très significatifs ( $P < 0,0001$ ). Le TC de pois d'angole est celui montrant la meilleure efficacité (en moyenne 95%), avec un effet significativement différent de celui des TC de manioc et de leucaena (respectivement en moyenne 87% et 87,5%). Il présente l'IC50 le plus élevé. Il n'y a pas de différence significative d'efficacité sur le développement larvaire entre les TC de leucaena et de manioc ( $P > 0,9999$ ). Globalement (tableaux 1, 2 et 3) les TC sont plus efficaces que l'albendazole sur les souches résistantes ( $P = 0,005$ ), alors qu'aucune différence significative avec le témoin albendazole n'est observée sur la souche non résistante ( $P = 0,005$ ). Les TC de manioc et de leucaena ont un effet significativement plus faible que celui de

l'ivermectine sur la souche non résistante, alors que l'effet est non significativement différent de celui des TC de manioc et de pois d'angole pour la souche mono-résistante (données manquantes pour la souche multi-résistante)

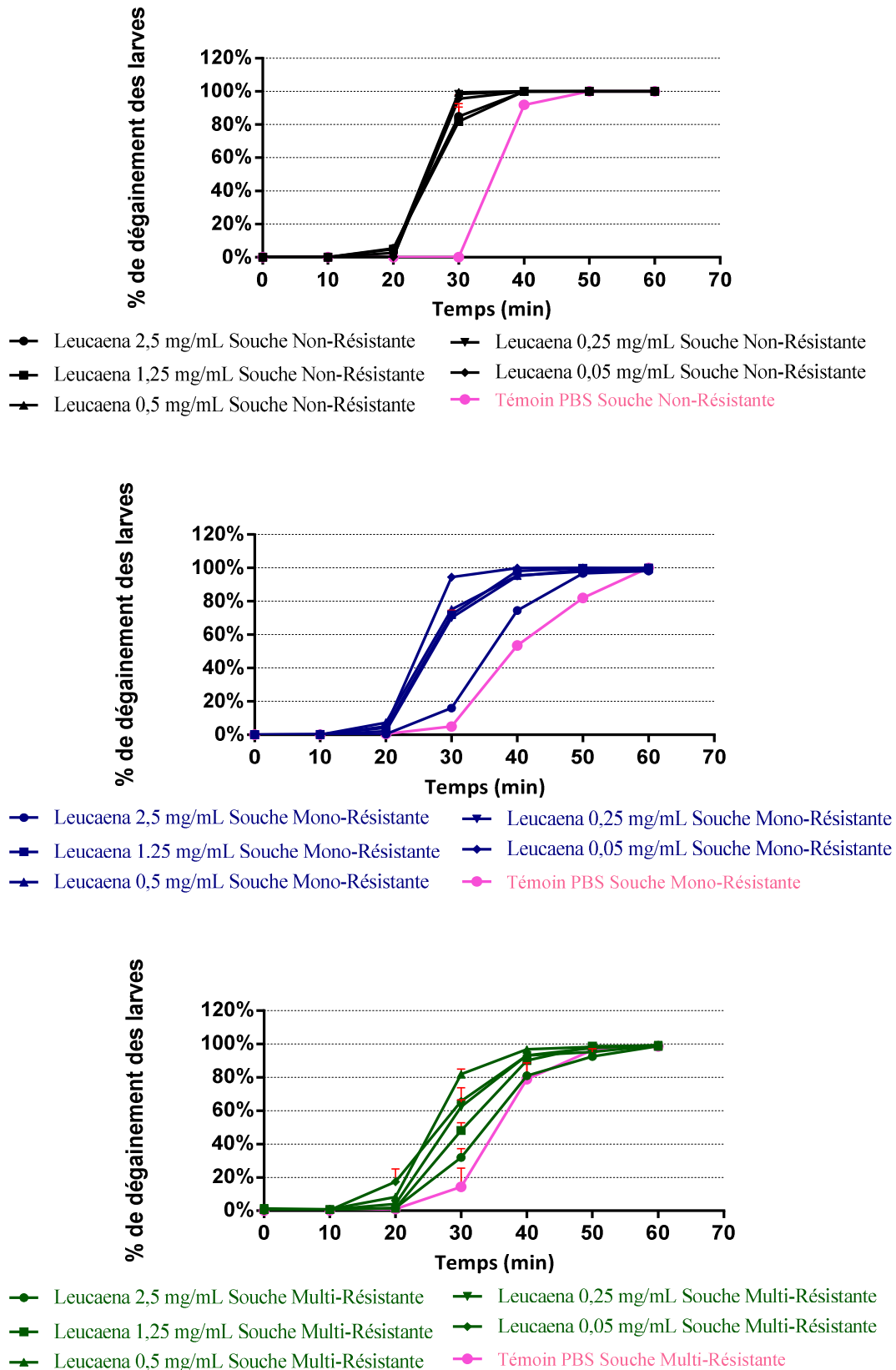
### Test de dégagement larvaire (LEA)

Les résultats du test de dégagement sont présentés sur les figures 6, 7 et 8.

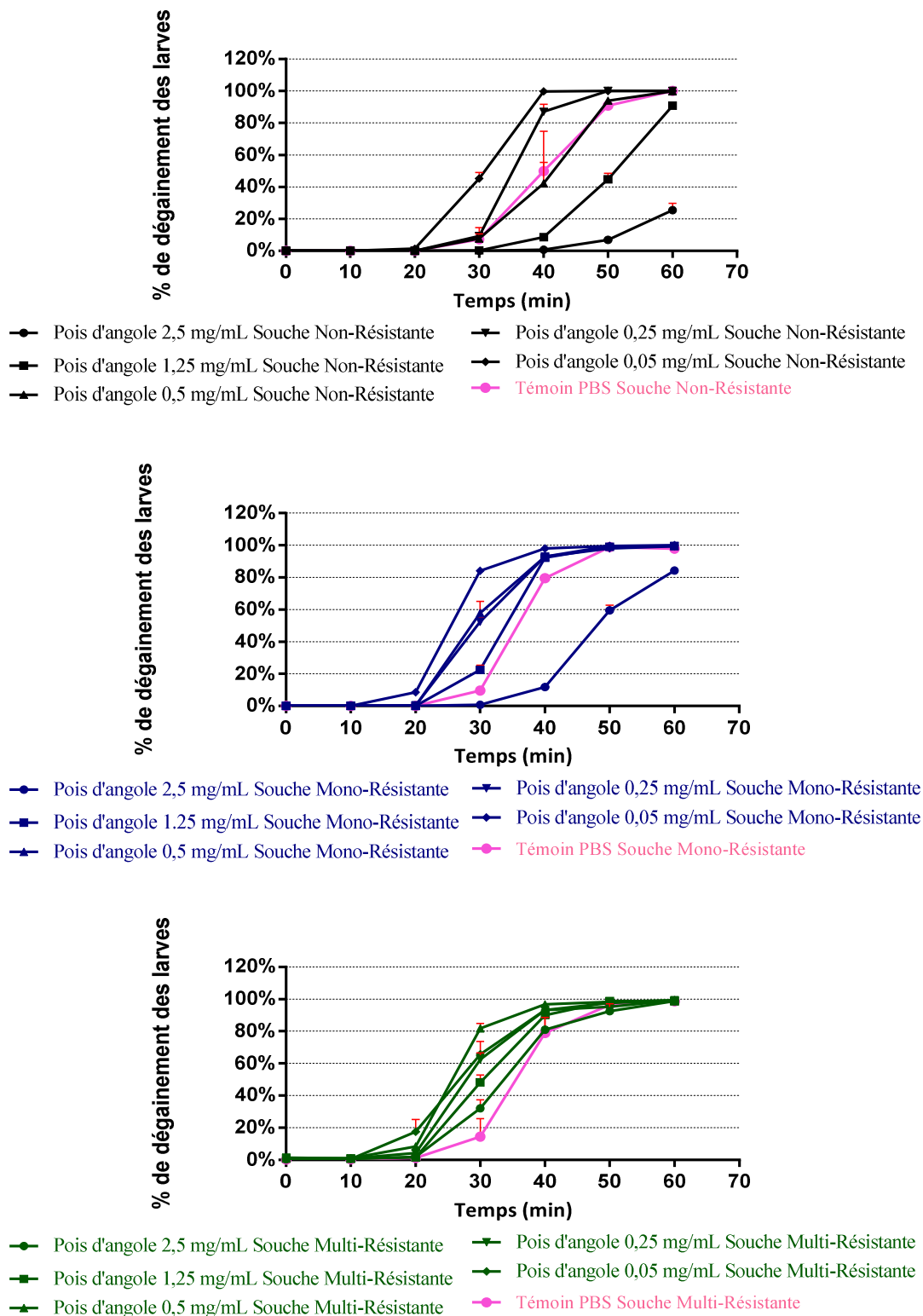
Il a été observé que 100% des larves *H.contortus* témoins étaient dégainées au bout de 50-60 minutes après avoir été mises en contact avec la solution hypochlorée (figure 6, 7 et 8). L'analyse de variance générale montre un effet plante dépendant ( $P < 0,0001$ ), souche dépendant ( $P < 0,0001$ ) et un effet dose dépendant ( $P < 0,0001$ ) pour la gamme de doses testées (voir figure 6, 7 et 8). Les TC de leucaena n'ont montré aucun effet significatif sur le dégagement des larves d' *Haemonchus contortus* pour les trois souches comparées au témoin PBS ( $P > 0,9999$ ) pour toute la gamme de doses testées (Fig.6).

Comparés au témoin PBS, les TC de pois d'angole ont montré un effet significatif ( $P < 0,0001$ ) sur la souche non-résistante (figure 7). Un effet dose est observé comme le montre les figure 7 et 8 sur les souches résistantes. En effet, les TC de pois d'angole testées aux doses inférieurs à 1,25 mg/mL ne montrent aucun effet significatif ( $P > 0,9999$ ) (Fig.7). Néanmoins, un retard sur le dégagement de larves non-résistantes à la dose de 1,25 mg/mL a été observé (90,893%  $\pm$  1,678 de dégagement à 60 minutes) ( $P = 0,0120$ ) alors qu'à cette même dose, aucun effet significatif ( $P > 0,9999$ ) n'est observé pour les souches mono et multi résistantes (99,483%  $\pm$  0,1696 et 99,725%  $\pm$  0,174 de dégagement). Par ailleurs, les TC de pois d'angole à une dose de 2,5 mg/mL ont un effet inhibiteur quasi-totale (25,48833%  $\pm$  4,328471 de dégagement à 60 minutes) ( $P < 0,0001$ ) sur la souche non-résistante aux anthelminthiques chimiques alors qu'à cette même dose pour les souches résistantes à ces anthelminthiques, les TC de pois d'angole ont un effet significatif sur la souche mono-résistante (84,22%  $\pm$  0,799 de dégagement à 60 minutes) ( $P < 0,0001$ ) mais bien moins significatif que sur les larves non-résistantes et aucun effet significatif sur la souche multi- résistante (97,50%  $\pm$  1,041 de dégagement à 60 minutes) ( $P > 0,9999$ ). Cet effet dose brutal, n'a pas permis de calculer l'IC50 des TC de pois d'angole à  $t_{60}$  min.

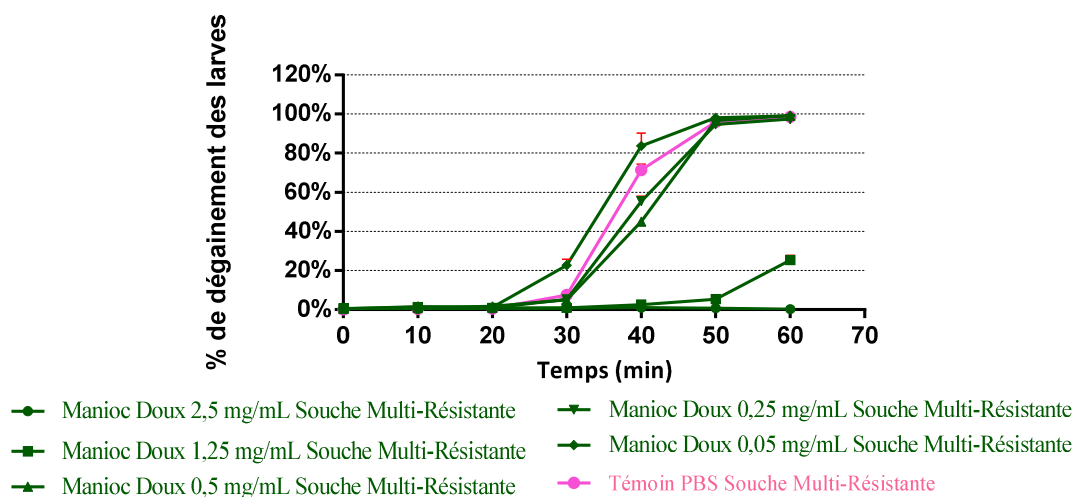
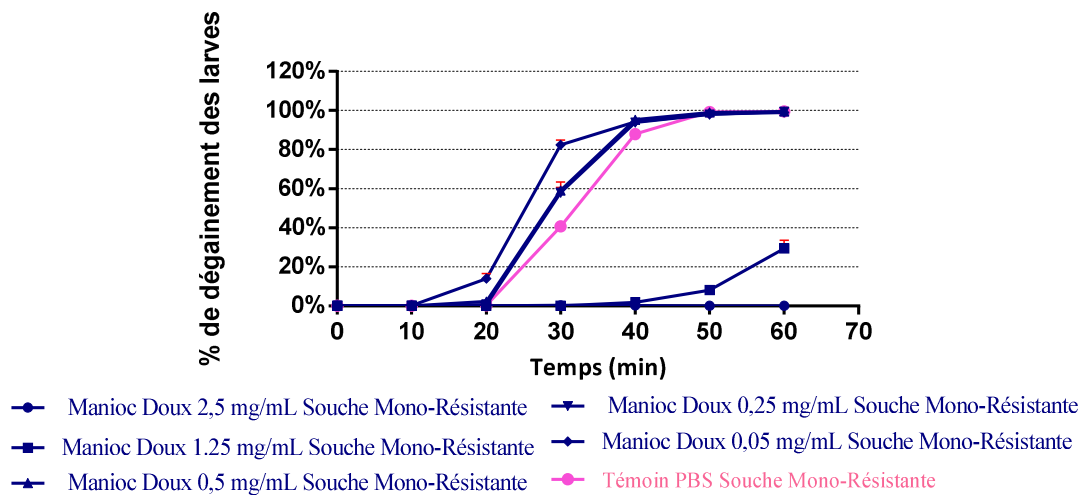
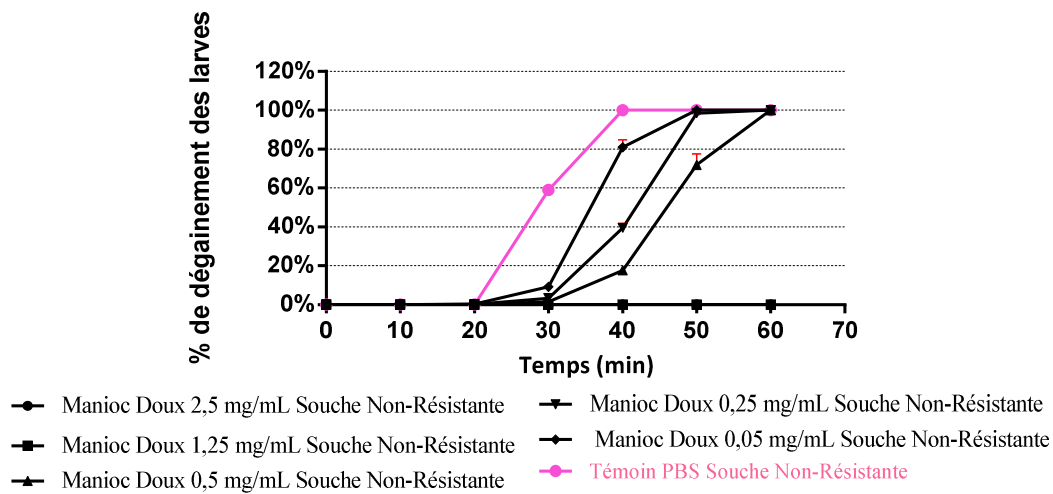




**Figure 6.** Effet de 3h d'incubation de trois souches de L3 *H.contortus* avec plusieurs doses de tanins condensés de *Leucaena* et un témoin négatif sur le processus de dégaineement artificiel *in vitro* pour chaque souche. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  S.E.M) de 6 répétitions par dose pour les trois souches.



**Figure 7.** Effet de 3h d'incubation de trois souches de L3 *H. contortus* avec plusieurs doses de tanins condensés de Pois d'angole et un témoin négatif sur le processus de dégagement artificiel *in vitro* pour chaque souche. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  S.E.M) de 6 répétitions par dose pour les trois souches.

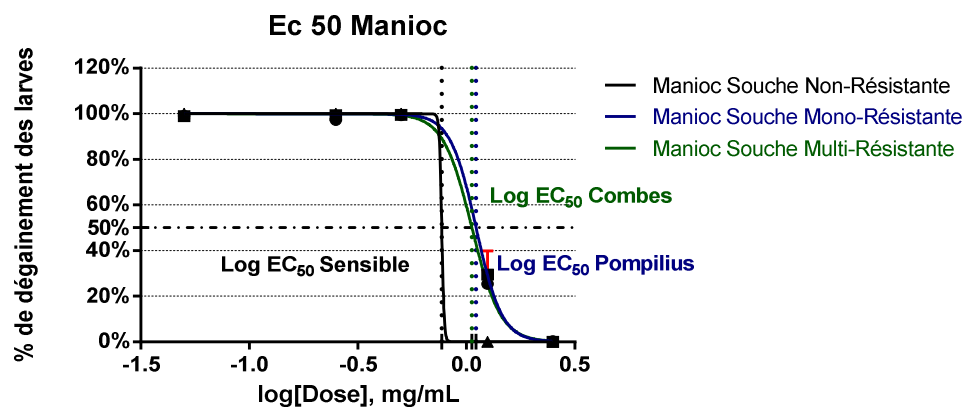


**Figure 8.** Effet de 3h d'incubation de trois souches de L3 *H. contortus* avec plusieurs doses de tanins condensés de Manioc Doux et un témoin négatif sur le processus de dégainement artificiel *in vitro* pour chaque souche. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$  S.E.M) de 6 répétitions par dose pour les trois souches.

Les TC de manioc ont montré un effet significatif sur le dégainement larvaire (Fig.8) pour les trois souches ( $P < 0,0001$ ), comparées au témoin PBS. Il n'y a pas de différence significative entre les souches ( $P > 0,9999$ ). Un effet dose significatif ( $P < 0,0001$ ) est observé à partir de la dose 1,25 mg/ml.

Par ailleurs, deux doses de TC de manioc de la gamme testée 2,5 et 1,25 mg/ml, les plus fortes ont eu un effet très significatif sur le dégainement des larves *H.contortus* (Fig.8). Une inhibition du dégainement presque totale est observée sur les larves des souches mono-résistantes ayant été mise en contact avec les TC de Manioc à une dose de 1,25 mg/mL, avec 29,425% ( $\pm 4,256$ ) de dégainement et multi-résistantes avec 25,335% ( $\pm 2,320$ ) de dégainement ce qui représente un effet très significatif ( $P < 0,0001$ ) alors qu'à cette même dose pour la souche non-résistante une inhibition totale est constatée (0% de dégainement) ( $P < 0,0001$ ). De plus, concernant la dose de TC de manioc testée la plus forte (2,5 mg/mL), une inhibition totale pour les trois souches est constatée (0% de dégainement) ( $P < 0,0001$ ).

**Figure 9.** Régression non-linéaire du pourcentage de dégainement des larves



selon leur souche en fonction du logarithme des doses testées de TC de Manioc.

La concentration inhibitrice de 50 % de dégainement larvaire (IC 50) calculée à 60 min, (correspondant au maximum de dégainement du témoin PBS), montre qu'aucune différence significative n'est observée entre les différentes souches ( $P = 0,8799$ ), avec une valeur de 1,098 mg/mL (Fig.9).

En résumé, les TC de *leucaena* n'ont aucun effet significatif sur le dégagement des larves, les TC de pois d'angle ont un effet significatif sur la souche non-résistante aux anthelminthiques chimiques et cet effet a une tendance à diminuer voir à disparaître totalement sur les souches résistantes à un ou plusieurs anthelminthiques chimiques. Les TC de manioc sont les plus efficaces et montrent un effet très significatif sur le dégagement larvaire par rapport aux autres TC.

## 2- Chromatographie Liquide à Haute pression (HPLC)

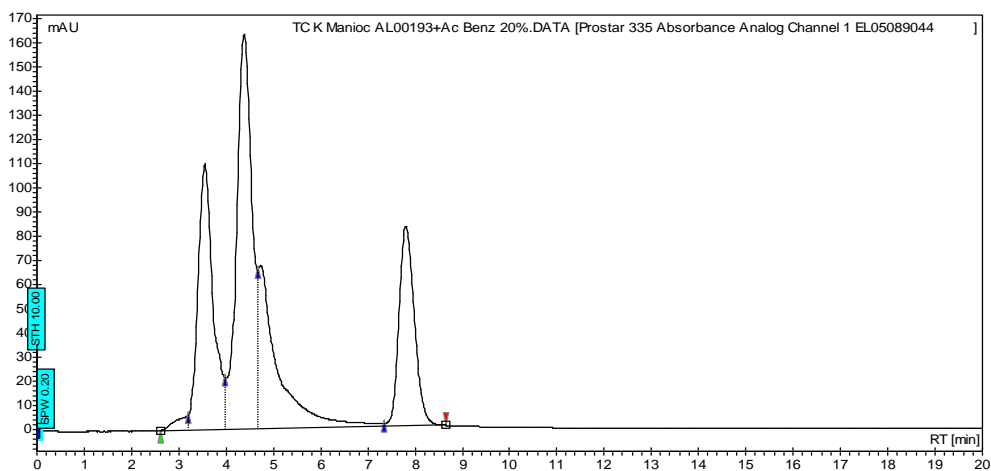


Figure 10. Chromatogramme TC Manioc

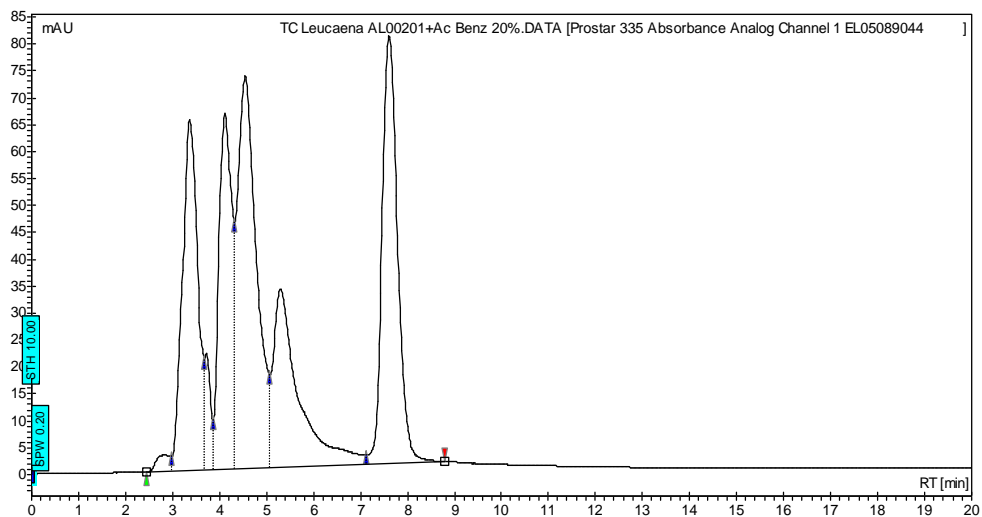


Figure 11. Chromatogramme TC leucaena

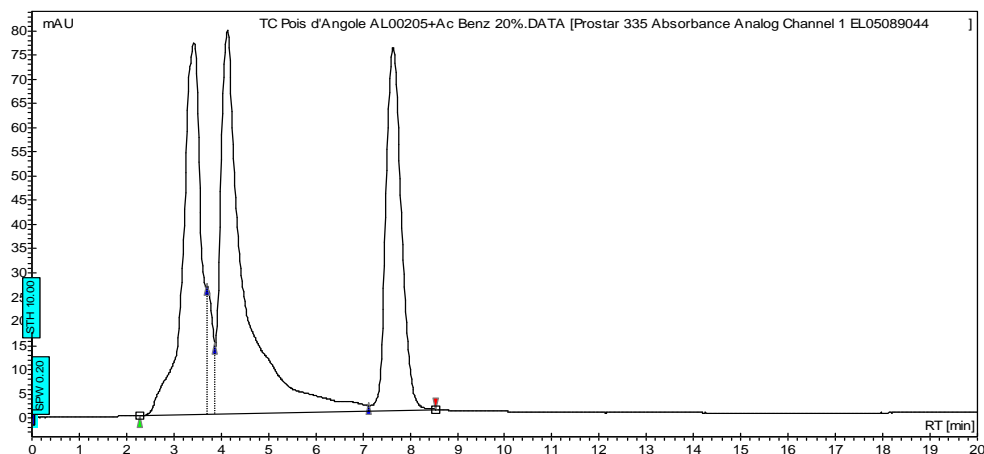


Figure 12. Chromatogramme TC Pois d'angle

Plante		Temps de rétention (T <sub>R</sub> )	λ <sub>max</sub> (nm)	Δ T <sub>R</sub> = T <sub>R</sub> acide benzoïque - T <sub>R</sub> Composé
Manioc	Composé 1	3,19	231	4,61
	Composé 2	3,55	232	4,25
	Composé 3	4,39	231	3,41
	Composé 4	4,73	261	3,07
	Acide benzoïque	7,8	232	0
Leucena	Composé 1	2,81	231	4,79
	Composé 2	3,36	231	4,24
	Composé 3	3,72	211	3,88
	Composé 4	4,12	231	3,48
	Composé 5	4,55	255	3,05
	Composé 6	5,29	254	2,31
	Acide benzoïque	7,6	232	0
Pois d'angle	Composé 1	3,43	231	4,21
	Composé 2	3,71	211	3,93
	Composé 3	4,13	230	3,51
	Acide benzoïque	7,64	232	0

Composé commun aux trois TC
  Composé commun aux TC de leucaena et de manioc  
 Composé commun aux TC de leucaena et de pois d'angle

Figure 11. Tableau récapitulatif des résultats HPLC.

L'analyse qualitative par HPLC montre que les composés ont une absorbance maximum comprise dans l'intervalle 210 à 270 nm. L'étalon interne acide benzoïque a un temps de rétention moyen de 7,7 min et une absorbance maximum de 232 nm. .

Les valeurs de  $\Delta T_R$  et des  $\lambda_{max}$  (Fig. 11) montrent a priori que :

Les trois plantes ont un composé commun ( $\Delta T_R = 4,2$  ;  $\lambda_{max} = 230$  nm).

Le Leucaena et le Pois d'angole ont deux composés en commun (respectivement composés 4 et 3,  $\Delta T_R = 3,5$  ;  $\lambda_{max} = 230$  nm ; et composés 3 et 2,  $\Delta T_R = 3,9$ ;  $\lambda_{max} = 210$  nm)

Le Leucaena et le Manioc ont un composé en commun (respectivement composés 5 et 4,  $\Delta T_R = 3,1$  ;  $\lambda_{max} = 260$  nm)

## IV- Discussion

L'objectif général de cette étude était d'étudier *in vitro* l'activité anthelminthique des TC de trois plantes d'intérêt décrite précédemment sur différents stades de développement (stade L1 et stade infestant L3) de trois souches du parasite *H.contortus*, afin de mieux comprendre leur mode d'action.

Le type de tests *in vitro* sont tellement variés qu'il peut être encore discuté de la nature du test à réaliser. Le choix s'est porté sur un test appliqué pour la détection de résistance aux anthelminthiques chimiques (Hubert and Kerboeuf, 1992) concernant le développement larvaire stade L1 à L3 ainsi qu'un autre évaluant le dégagement des larves au stade L3. Ces tests sont assez pertinents car ils sont une référence en parasitologie et d'autre part visent des mécanismes clés de la vie du parasite.

La plupart des études *in vitro* utilisait des extraits de plantes riches en métabolites secondaires sur divers stades de développement. L'ajout d'inhibiteurs de tanins tels que le polyéthylène glycol (PEG) ou de la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) restaurent partiellement (Azando et al., 2011) ou totalement (Bahuaud et al., 2006) vers les valeurs de contrôle. Cela a donc conduit à la conclusion que les flavonoïdes et, en particulier les tanins étaient principalement responsables de l'activité anthelminthiques des plantes mais qu'outre les TC, d'autres classes de composés peuvent aussi avoir un effet anthelminthique. En utilisant les TC purifiés directement, il est donc certain que l'activité observée leur est attribuée.

Par ailleurs, la gamme de doses testées a été choisie de sorte qu'elle se situe dans l'intervalle de doses utilisées dans la bibliographie tout en étant en deçà des doses utilisées pour les essais *in vivo*, étant elles-mêmes déjà non-toxiques pour les animaux. En effet, une relation dose-dépendante entre l'efficacité anthelminthique et les concentrations d'extraits de TC a été confirmée notamment par les deux tests réalisés et dans la littérature (Barrau et al., 2005; Molan et al., 2003; Paolini et al., 2004).

Les TC des trois plantes testées ont montré un fort effet inhibiteur sur le développement larvaire d'*H.contortus*. Une autre étude (Athanasidou et al., 2001) a montré que les TC de quebracho n'ont pas d'effet sur le développement des larves de *H.contortus* (Athanasidou et al., 2001). Concernant le dégagement des larves, les TC des trois plantes ont un effet différent



et cela sur les trois souches de *H. contortus*. Ces éléments viennent donc confirmer que les TC des plantes sont complexes, et peuvent donc conduire à des effets variables. Les TC forment un large groupe de composés ayant une grande complexité et diversité chimique. En effet, les TC sont composés d'isomères ayant une polarité similaire mais possédant des structures chimiques différentes (Marie-Magdeleine et al., 2010). Cela a été confirmé par nos analyses préliminaires HPLC, qui ont montré que les TC de manioc, leucaena et pois d'angole étaient de compositions différentes, mais très proches en structure (pics rapprochés). De plus, cette analyse a montré que TC de manioc, leucaena et pois d'angole contiennent des composés communs et spécifiques. Des études ont comparé l'activité anthelminthique de différents monomères (flavane-3-ols) qui sont les unités de bases constituant les différentes classes de TC. La majorité des résultats obtenus sur divers essais biologiques *in vitro* (Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al., 2008a; Molan et al., 2003) a abouti à des hypothèses quant au lien entre effet et structure chimique des monomères:

- Les monomères de prodelphidines (PD) avaient généralement une plus grande activité anthelminthique que les monomères des procyanidines (PC) (Molan et al., 2003).
- Le nombre de groupe libre OH (hydroxyle) semble un facteur-clé de la structure biochimique liée à l'activité anthelminthique des composés de flavan-3-ol peut favoriser des liaisons hydrogène avec les protéines de larvaires (Brunet and Hoste, 2006).

De même, les monomères de flavan-3-ol, qui sont les constituants monomériques de PD ont une plus grande activité anthelminthique par rapport aux monomères de PC dans le développement des larves, l'éclosion des œufs (Molan et al., 2003) et de dégagement des larves (Brunet and Hoste, 2006). Par ailleurs, la galloylation des flavane-3-ols a souvent été associée à une plus grande activité contre les nématodes (Brunet and Hoste, 2006; Molan et al., 2003). Ceci pourrait expliquer les différences d'efficacité des TC de manioc, de leucaena et de pois d'angole en ce qui concerne le dégagement larvaire. Les TC de manioc qui ont montré un effet inhibiteur très significatif sur le dégagement des larves pourraient être ainsi constitués d'une plus grande quantité de monomères de PD gallates que les TC de pois d'angole et de leucaena. Les composés communs aux 3 plantes, retrouvés en HPLC pourraient être responsables de cette activité sur le développement larvaire. Des explorations plus poussées en termes quantitatifs (composition en PD) et qualitatifs (taille des polymères) devraient permettre d'expliquer l'effet spécifique sur le dégagement et les différences de niveaux d'efficacité. Les expériences futures auront besoin d'étudier séparément les contributions relatives de la taille des polymères et la teneur en PD.

Les TC affectent directement la biologie du parasite notamment des altérations du corps externe, avec dissociations entre la cuticule et l'hypoderme sous-jacents, et des signes de dégénérescence et / ou la mort de hypodermique, cellules musculaires et intestinaux et indirectement la biologie du nématode en améliorant la réponse immunitaire de l'hôte (Hoste et al., 2012). Par ailleurs, le fait que les trois TC ont un effet significatif sur le développement larvaire et que leur effet différent sur le dégainement des larves L3 infestantes signifie que certains composés des TC ne sont pas capable d'endommager ou de traverser la cuticule des L3. En outre, quand une souche est résistante à plusieurs types d'anthelminthiques chimiques, une légère résistance aux effets des TC est observée comme le décrit nos résultats des tests de dégainement concernant le TC de pois d'angole et de manioc notamment la dose 1,25 mg/mL qui montre une inhibition partielle en ce qui concerne les souches résistante et une inhibition totale en ce qui concerne la souche non-résistante aux anthelminthiques chimiques. L'hypothèse peut être avancée que les TC ont des cibles communes aux anthelminthiques chimiques comme la tubuline des parasites, cible des benzimidazoles ; stimuler la libération de l'acide gamma-aminobutyrique, à l'origine du blocage de l'influx nerveux moteur, cible des avermectines. Il est connu que le processus de dégainement larvaire résulte de l'action de certaines enzymes, y compris les protéases et les protéines larvaire de la gaine (Gamble et al., 1989). L'étude de la composition biochimique de la gaine des nématodes a mis en exergue le fait que les collagènes comme les protéines et les protéines non collagène comme (cuticline), possèdent une teneur élevée à la fois en proline et en hydroxyproline (Brunet and Hoste, 2006). De plus, des variations d'affinités des différentes unités de flavan-3-ols ont récemment été soulignées à l'aide de poly (L-proline). Il a été observé que les flavan-3-ols gallates ont une plus grande affinité avec les poly (L-proline) (Poncet-Legrand et al., 2007) donc avec la gaine des nématodes riches en proline et en hydroxyproline. Il serait intéressant de compléter cette étude en observant l'effet sur une autre espèce de nématode tel *Trichostrongylus colubriformis* car des différences concernant le dégainement larvaire entre *H.contortus* et ce dernier ont été observées. L'hypothèse a été émise que les différences de dégainement larvaire des deux espèces peuvent s'expliquer au niveau moléculaire par les différences dans la susceptibilité aux monomères de TC entre *H.contortus* et *T.colubriformis* qui pourraient résulter des différences spécifiques dans la composition de la gaine et/ou des enzymes de dégainement de chaque espèces (Brunet and Hoste, 2006).

En résumé, les propriétés anthelminthiques des TC ne sont plus à démontrer, cependant, la structure chimique des TC notamment le pourcentage de PD, la galloylation, le nombre de

groupe hydroxyle et la taille des polymères de TC qui diffèrent d'une plante à l'autre expliquent les différences constatées concernant l'activité anthelminthique des TC. Une légère résistance aux TC apparaît pour les souches de plus en plus résistantes aux anthelminthiques chimiques. Ce résultat laisse à penser que certains constituants des TC pourraient avoir un mode d'action proche de celui des anthelminthiques chimiques.

Les expériences futures auront besoin d'étudier séparément les contributions relatives de la taille des polymères de TC et des PD. Les résultats actuels *in vitro* doivent être vérifiés et complétés par des études *in vivo* et ce, sur d'autres espèces de SGI.

## V- Conclusion et Perspectives

Les résultats de cette étude montrent bien que les TC de manioc, leucaena et pois d'angole ont tous trois un effet anthelminthique. Cependant, ces TC montrent des effets différents concernant le dégainement des larves L3 infestant de *H.contortus* ce qui peut s'expliquer par les différences de structure chimiques entre les TC de manioc, leucaena et pois d'angole. Une étude plus poussée de la composition chimique des TC de ces trois plantes pourrait permettre une meilleure compréhension de l'interaction entre les TC et les parasites. Une meilleure compréhension du mode d'action des TC et de leur effet spécifiques ou non spécifiques sur les processus biologiques des parasites devraient fournir certaines indications des problèmes posés par le développement de résistance à l'encontre de ces composés. L'expérience vécue avec les anthelminthiques chimiques a mise en avant le fait que l'on ne peut pas compter sur une seule solution pour lutter contre les nématodes parasites chez les ruminants. L'utilisation des TC pour limiter l'utilisation d'anthelminthiques chimiques peut donc aider au contrôle intégré des parasites gastro-intestinaux.

## Références Bibliographiques

- Arbonnier, M., 2002. Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest 2ème éd.- Montpellier : CIRAD, MNHN, 417.
- Assis, L.M., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Vieira, L.S., Costa, C.T.C., Souza, J.A.L., 2003. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology* 117, 43-49.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Veterinary parasitology* 99, 205-219.
- Azando, E.V., Hounzangbe-Adote, M.S., Olounlade, P.A., Brunet, S., Fabre, N., Valentin, A., Hoste, H., 2011. Involvement of tannins and flavonoids in the in vitro effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Veterinary parasitology* 180, 292-297.
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545-554.
- 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., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7481-7487.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008a. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International journal for parasitology* 38, 783-790.
- Brunet, S., Montellano, C.M.-O.d., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H., 2008b. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology* 157, 81-88.
- Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris Cachan : Éd. Tec & doc Éd. médicales internationales, Paris Cachan.
- Da Cruz, D.G., da Rocha, L.O., Arruda, S.S., Palieraqui, J.G.B., Cordeiro, R.C., Santos Junior, E., Molento, M.B., de Paula Santos, C., 2010. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Veterinary Parasitology* 170, 340-343.
- DeRosa, A.A., Chirgwin, S.R., Fletcher, J., Williams, J.C., Klei, T.R., 2005. Exsheathment of *Ostertagia ostertagi* infective larvae following exposure to bovine rumen contents derived from low and high roughage diets. *Veterinary parasitology* 129, 77-81.

- Ezike, A., Akah, P., Okoli, C., Okpala, C., 2010. Experimental evidence for the antidiabetic activity of *Cajanus cajan* leaves in rats, Vol 1, 81-84 pp.
- Gamble, H.R., Lichtenfels, J.R., Purcell, J.P., 1989. Light and scanning electron microscopy of the ecdysis of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of Parasitology* 75, 303-307.
- Hertzberg, H., Huwyler, U., Kohler, L., Rehbein, S., Wanner, M., 2002. Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae in vivo and in vitro. *Parasitology* 125, 65-70.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in parasitology* 22, 253-261.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary parasitology* 186, 18-27.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology* 180, 144-154.
- Hounzangbe-Adote, M.S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H., 2005. In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in veterinary science* 78, 155-160.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record* 130, 442-446.
- Kong, Y., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Chang, F.-R., Chen, Y.-H., Liu, X.-L., Stelten, J., Schiebel, H.-M., 2010. *Cajanus* lactone, a new coumarin with anti-bacterial activity from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chemistry* 121, 1150-1155.
- Laurent, M., 2013. *Le journal de l'IRD Sciences au sud* n° 70, 13.
- Luo, M., Liu, X., Zu, Y., Fu, Y., Zhang, S., Yao, L., Efferth, T., 2010. *Cajanol*, a novel anticancer agent from Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] roots, induces apoptosis in human breast cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway. *Chemico-biological interactions* 188, 151-160.
- Luo, Q.F., Sun, L., Si, J.Y., Chen, D.H., 2008. Hypocholesterolemic effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 15, 932-939.
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H., 2010. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology* 173, 85-92.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106, 3-19.
- Min, B.R., Pinchak, W.E., Fulford, J.D., Puchala, R., 2005. Effect of feed additives on in vitro and in vivo rumen characteristics and frothy bloat dynamics in steers grazing wheat pasture. *Animal Feed Science and Technology* 123-124 PART 2, 615-629.

- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International journal for parasitology* 33, 1691-1698.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Hoste, H., Ferre, I., 2013. In vitro effect of heather (*Ericaceae*) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 197, 235-243.
- Nicholson, R.A., David, L.S., Pan, R.L., Liu, X.M., 2010. Pinostrobin from *Cajanus cajan* (L.) Millsp. inhibits sodium channel-activated depolarization of mouse brain synaptoneuroosomes. *Fitoterapia* 81, 826-829.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A., Robertson, H.A., Shelton, D., Waghorn, G.C., Green, R., 2002. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Veterinary parasitology* 105, 229-245.
- Pal, D., Mishra, P., Sachan, N., Ghosh, A.K., 2011. Biological activities and medicinal properties of *Cajanus cajan* (L) Millsp. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* 2, 207-214.
- Paolini, V., 2004. Effet des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux chez la chèvre. Université de Perpignan Perpignan.
- Paolini, V., Bergeaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchie, P., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology* 113, 253-261.
- Paolini, V., Fouraste, I., Koste, H., 2004. In vitro effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 129, 69-77.
- Pomroy, W.E., Adlington, B.A., 2006. Efficacy of short-term feeding of sulla (*Hedysarum coronarium*) to young goats against a mixed burden of gastrointestinal nematodes. *Veterinary parasitology* 136, 363-366.
- Poncet-Légrand, C., Gautier, C., Cheynier, V., Imbert, A., 2007. Interactions between Flavan-3-ols and Poly(l-proline) Studied by Isothermal Titration Calorimetry: Effect of the Tannin Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9235-9240.
- Rizk, M.Z., Aly, H.F., Abo-Elmatty, D.M., Desoky, M.M., Ibrahim, N., Younis, E.A., 2014. Hepatoprotective effect of *Caesalpinia gilliesii* and *Cajanus cajan* proteins against acetaminophen overdose-induced hepatic damage. *Toxicology and industrial health*.
- Sendow, J., 2003. *Haemonchus contortus*, Animal Diversity Web. University of Michigan Museum of zoology.
- Shelton, H.M., Brewbaker, J.L., 1998. Forage Tree Legumes in Tropical Agriculture. *Leucaena leucocephala* - the Most Widely Used Forage Tree Legume.
- Siddhartha, S., Archana, M., Jinu, J., Pradeep, M., 2009. Anthelmintic potential of *Andrographis paniculata*, *Cajanus cajan* and *Silybum marianum*. *Pharmacognosy Journal* 1, 243-245.
- Tien Dung, N., Thi Mui, N., Ledin, I., 2005. Effect of replacing a commercial concentrate with cassava hay (*Manihot esculenta* Crantz) on the performance of growing goats. *Animal Feed Science and Technology* 119, 271-281.

- TRAMIL, 1999. Pharmacopée Caribéenne. L. Germosen-Robineau, Fort-de-France, FWI.
- Veríssimo, C.J., Niciura, S.C.M., Alberti, A.L.L., Rodrigues, C.F.C., Barbosa, C.M.P., Chiebao, D.P., Cardoso, D., da Silva, G.S., Pereira, J.R., Margatho, L.F.F., da Costa, R.L.D., Nardon, R.F., Ueno, T.E.H., Curci, V.C.L.M., Molento, M.B., 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology* 187, 209-216.
- Wu, N., Fu, K., Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chang, F.R., Chen, Y.H., Liu, X.L., Kong, Y., Liu, W., Gu, C.B., 2009. Antioxidant activities of extracts and main components of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Molecules* 14, 1032-1043.
- Zu, Y.G., Liu, X.L., Fu, Y.J., Wu, N., Kong, Y., Wink, M., 2010. Chemical composition of the SFE-CO extracts from *Cajanus cajan* (L.) Huth and their antimicrobial activity in vitro and in vivo. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17, 1095-1101.



---