



Contribution à l'évaluation de plantes tropicales pour un usage anthelminthique

Pierre Dimitri

► To cite this version:

Pierre Dimitri. Contribution à l'évaluation de plantes tropicales pour un usage anthelminthique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. hal-03216334

HAL Id: hal-03216334

<https://hal.inrae.fr/hal-03216334>

Submitted on 3 May 2021

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 - NoDerivatives 4.0 International License



Contribution à l'évaluation de plantes tropicales pour un usage anthelminthique

TUTRICE : MARIE-MAGDELEINE Carine

Université des Antilles | L3 Sciences Pour la Santé : Biochimie-Sciences de l'aliment | INRAE

REMERCIEMENTS

A madame Carine Marie-Magdeleine-Chevry

D'une part pour m'avoir admis en tant que stagiaire au sein de son unité de recherche.
De l'autre, pour son soutien et son implication pendant et après la période de stage.
Merci de m'avoir permis de poursuivre mon stage (IUT de la Guadeloupe 2019 – 2020)
et d'approfondir mes connaissances du monde de la recherche, notamment sur des
thématiques s'appliquant à la Guadeloupe

A monsieur Lucien Philibert

Pour son encadrement quotidien. Ainsi que pour m'avoir permis de réaliser mon stage
dans les meilleures conditions possibles en dépit des contraintes. Grace à vous j'ai plus
de cordes à mon arc, aujourd'hui mes compétences scientifiques ont évoluées et solide
qu'hier.

SOMMAIRE

I) Liste des abréviations.....	3
II) Introduction.....	4
A) Contexte et objectifs	
B) Synthèse bibliographique	
1. Les métabolites secondaires des plantes	
2. Le parasite <i>Haemonchus contortus</i>	
III) Matériels & Méthodes.....	10
1. Matériel végétal, matériel parasitaire, produits et réactifs	
2. Méthodes : screening phytochimique, test de dégagement larvaire	
IV) Résultats & Discussions.....	20
1. Screening phytochimique	
2. Test anthelminthique sur Lévamisol	
V) Conclusion.....	23
VII) Références bibliographiques.....	24
VIII) Annexes.....	25
IX) Résumé.....	27
X) Abstract.....	28

Liste des abréviations

- ***H. Contortus*** : *Haemonchus contortus*
- **INRAe** : Institut National de Recherches pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
- **%Gainée** : Pourcentage de L3 gainée
- **%MOY Gainée** : Pourcentage moyen de L3 gainée
- **%Dégainée** : Pourcentage moyen de L3 gainée
- **%MOY Gainée** : Pourcentage moyen de L3 gainée

Introduction

A) Contexte et objectifs

En élevage de petits ruminants, les infestations par des nématodes parasites du tube digestif, comme le parasite *Haemonchus contortus* (100% de prévalence), sont une contrainte majeure pour l'élevage au pâturage. En effet, cette maladie, impactant de manière néfaste les performances, entraîne de fortes pertes de production (Hernández-Castellano et al., 2019). Le mode principal de lutte contre ces nématodes repose sur l'emploi systématique et répété de traitements anthelminthiques de synthèse. Ces traitements, effectués sans évaluation préliminaire du risque parasitaire réel, et administrés de manière systématique, ont des conséquences nuisibles sur le développement de l'immunité de l'animal, sur l'environnement et sur le revenu de l'éleveur. De plus, le risque d'émergence de résistances s'accroît (Kaplan and Vidyashankar, 2012), ce qui réduit l'arsenal thérapeutique. 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.

Dans ce contexte, il devient nécessaire de lutter contre les parasites en trouvant des alternatives plus économiques et plus naturelles. L'utilisation de plantes tropicales dont les métabolites secondaires à effet anthelminthique, constitue une alternative phytothérapeutique aux molécules anthelminthiques de synthèse. C'est dans ce cadre que se situent les travaux de lutte intégrée menés à INRAE URZ.

Ce stage s'inscrit dans un projet dont l'objectif est de comparer l'effet d'un mélange de plantes tropicales, à celui des anthelminthiques chimiques. L'objectif du stage est de contribuer à l'étude par la mise en évidence des principaux métabolites secondaires du mélange de plantes et par l'évaluation de l'effet d'un produit anthelminthique sur le parasite *Haemonchus contortus*.

B) Synthèse bibliographique

1. Les métabolites secondaires des plantes

Les métabolites secondaires sont des molécules qui n'appartiennent pas à la classe des métabolites primaires (acides aminés, lipides, sucres, acides nucléiques).

Les métabolites secondaires sont spécifiques des plantes, des champignons et des bactéries.

Ce sont des éléments indispensables au bon développement et à la survie de la plante. Ils ont des rôles très variés mais nécessaires à la croissance de la plante :

- Rôle de défense (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs)
- Rôle dans la communication entre les plantes (messages d'alerte par exemple)
- Rôle pour attirer les insectes pollinisateurs

On distingue trois grands types de métabolites secondaires :

- Les composés phénoliques : regroupant les tanins, lignine, flavonoïdes
- Les composés azotés : regroupant les alcaloïdes, la bétalaïne, les hétérosides cyanogènes et glucosinolates
- Les composés terpéniques : regroupant les hémiterpènes (C5), les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les triterpènes (C30), les tétraterpènes (C40) et les polyterpènes (+ que C40).

Les principaux métabolites secondaires

Les Phénols

Les phénols sont des molécules jouant un rôle dans la défense des plantes. Ils peuvent protéger les plantes contre les rayonnements UV ou encore agir comme agent de défense contre les pathogènes. Les composés phénoliques peuvent intervenir dans la baisse du taux sanguin, la réduction de certains cancers et maladies cardiovasculaires.

Les Tanins

Les tanins sont des composés faisant précipiter les protéines, ce qui explique la sensation d'assèchement. Ils ont aussi un rôle dans la protection contre les toxicités induites par différents agents (UV, métaux lourds, pollution...). Les tanins sont retrouvés dans le vin qui, grâce à ses propriétés anti oxydantes, a des effets bénéfiques sur la prévention de maladies cardio-vasculaires.

Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV et contre les infections bactériennes et virales. Ils sont responsables des pigments colorés des fleurs (servant à attirer les insectes pollinisateurs) ainsi que des goûts amers et astringents (servant à repousser les animaux herbivores)

Les Quinones

Les quinones jouent un rôle important dans la défense des plantes. Leur action antibactérienne et fongicide permet aux plantes de contrer les attaques des champignons et insectes. En médecine, leurs propriétés anticoagulantes et antispasmodiques bronchiques sont très exploitées.

Les Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances jouant un rôle de défense chez les plantes. En effet ils sont responsables de la toxicité de certaines plantes pouvant provoquer des contractions cardiaques et, à plus forte dose, un arrêt cardiaque.

Les alcaloïdes sont retrouvés dans la morphine et la quinine, qui sont des molécules très populaires pour leur pouvoir thérapeutique.

Les Anthocyanes

Les anthocyanes sont des molécules responsables de la couleur des feuilles, des fleurs, des fruits et des racines de beaucoup de plantes. On les retrouve dans les raisins noirs, les mûres, les prunes et permettent d'attirer les insectes pollinisateurs.

Les anthocyanes ont également un rôle protecteur car ils permettent d'absorber les rayons UV en agissant comme bouclier pour l'ADN et les composants cellulaires.

Leur activité antioxydante leur confère un rôle de protection contre les maladies cardiovasculaires.

Les Coumarines

Les coumarines sont des substances responsables de l'odeur du foin, rappelant la vanilline. Ces substances sont utilisées en médecine, notamment pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-œdémateuses.

Les Saponosides

Les saponosides sont des substances conférant aux plantes un pouvoir moussant. Ces substances sont très toxiques pour les animaux à sang froid.

Les saponosides sont exploités pour leurs vertus anti-inflammatoires, anti-œdémateuses et analgésiques. Leurs propriétés veinotropes sont très utiles dans les traitements de l'insuffisance veineuse.

Les Stérols et Triterpènes

Les stérols sont des lipides végétaux dont la structure est très proche de celle du cholestérol animal. De ce fait, ils sont utilisés pour faire baisser le taux de cholestérol dans le sang. Les triterpènes, eux, sont utilisés pour leurs propriétés immunomodulantes et potentiellement anti-cancéreuses.

2. Le parasite *Haemonchus contortus*

Le parasite *H. Contortus* appartient au règne *Animalia* et au sous-règne *Eumetazoa* (ou métazoaires supérieurs qui sont des organismes vivants pluricellulaires hétérotrophes). Ce parasite se trouve dans le groupe monophylétique *Nematozoa* et appartient à la classe *Nematoda* et au phylum *Secertentea*. C'est un *Trichostrongylidae* de la super-famille *Trichostrongyloidea* (Inventaire National du Patrimoine Naturel).

Le parasite *H. Contortus* adulte est visible à l'œil nu (voir figure.1) dans la muqueuse de l'*abomasum* de l'hôte. Il est de couleur rouge sombre, quelque peu rosé, ce qui s'explique par son mode de nutrition hématophage. Le mâle, plus petit que la femelle, mesure de 15 à 35 mm pour 0,4 à 0,6 mm de largeur. La femelle possède 2 cordons génitaux blancs, qui s'enroulent autour de l'œsophage (Chrétien A. et C., 2011).



Figure 1 : *H. Contortus* mâle à la surface de l'abomasum d'un mouton image by Ray Kaplan



Figure 2 : *H. Contortus* femelle (<https://www.studyblue.com>)

Le cycle biologique des vers *H. Contortus* s'effectue en deux phases (voir figure 3). La première est la phase libre, ou **exogène** qui se déroule en milieu extérieur. La deuxième est la phase parasitaire, ou phase **endogène** se déroule dans l'abomasum de l'hôte.

- Phase exogène

Les œufs pondus par le parasite se retrouvent dans les fèces de l'animal. Les œufs excrétés ont une température optimale de développement de 20-30°C. Ils ne se développent pas lorsque la température est trop basse, 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 de stade 1 (L1). Ces larves muent et deviennent des larves au stade 2 (L2) puis au stade 3 (L3) en 4 à 7 jours. La larve gainée au stade L3 est mobile et infestante. Dans le milieu extérieur, la larve peut survivre grâce à la présence de lipides dans les cellules intestinales.

- Phase endogène

Les larves L3 migrent sur les parties aériennes des végétaux au pâturage, où elles seront ingérées par les ruminants. Une fois ingérées, celles-ci vont alors perdre leur gaine dans l'*abomasum*. La mue se poursuit en larves de stade 4 (L4). Puis il y aura une différenciation sexuelle des individus au stade larvaire 5 (L5, stade immature). Après la maturation sexuelle, les vers adultes s'accouplent, et les femelles (figure 2) pondent des œufs, qui se retrouveront ensuite dans les excréments de l'hôte. Le parasite se fixe sur la muqueuse abomasale où il se nourrit du sang de l'animal, d'où son caractère hématophage.

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

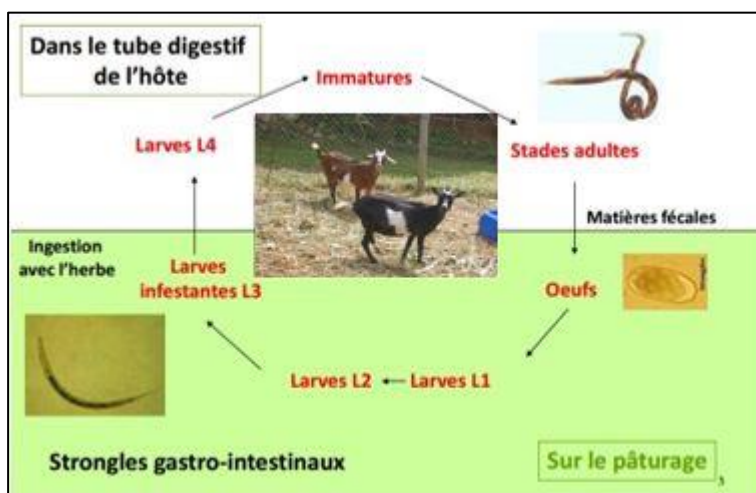


Figure 3 : Cycle du parasite *H. Contortus*

Physiopathologie du parasite

Après avoir été infectés, l'état général de l'animal se dégrade au fur et à mesure avec des signes d'amaigrissement, des chutes de laine, ou encore des lésions ou abcès. Cependant, les ruminants plus gravement atteints développent assez rapidement les symptômes d'une haemonchose, dont des hémorragies causées par le déplacement des larves adultes dans la caillette. Les infestés montrent alors des signes d'anémie, en plus d'une faiblesse et d'une respiration trop rapide. D'autres signes cliniques de son infestation peuvent être l'œdème sous-mandibulaire, plus communément appelé « signe de la bouteille » ou « bottle-jaw » ou encore des inflammations de la muqueuse. Mais la mort reste quand même la plus grave conséquence liée à l'infestation par *Haemonchus*.

Matériels & Méthodes

1. Matériel végétal, matériel parasitaire, produits et réactifs

Matériel végétal

Les échantillons végétaux testés sont 2 mélanges de plantes préalablement réalisés au laboratoire de l'URZ. Le matériel végétal a d'abord été séché à l'étuve ventilée à 40°C pendant 48 à 72h et a été ensuite réduit en poudre à l'aide d'un broyeur. Il est conservé à -20°C avant utilisation.

Matériel parasitaire

Les parasites utilisés pour les tests anthelminthiques sont issus de l'infestation expérimentale de cabris âgés de 4,5 mois. Les animaux, placés en cage individuelle à digestibilité, sont nourris exclusivement au **foin** durant l'expérience, et ont été préalablement traités avec des molécules chimiques : Oramec (ivermectine), Cestocur (anti-cestodes) et Polystrongles (lévamisole) afin de s'assurer de l'absence de tout parasite avant expérimentation. Ils ont ensuite été infestés au sein de l'unité expérimentale INRA PTEA, sur le site de Duclos à Petit-Bourg (Guadeloupe), avec chacun 5000 larves du parasite *Haemonchus contortus* au stade L3, per os.

Les fèces des animaux ont été recueillies 25 jours post-infestation et mis en culture automatiquement après récolte, pendant huit jours à température ambiante, en s'assurant d'une bonne humidité de la coproculture. Après coproculture, les larves au stade L3 sont extraites des fèces par le dispositif de BAERMANN (voir annexes). Les larves sont comptées puis concentrations et conservées à avant biotests in vitro au laboratoire.

Produits et réactifs

- Produit anthelminitique (AH) de synthèse : Le produit anthelminitique (AH) de synthèse, utilisé pour le test LEIA est le levamisole hydrochloride, dont le nom commercial est Levamisole, de la marque Applichem USA Panreac et d'origine Saint-Louis, Missouri USA.

Réactifs pour le screening phytochimique :

- Acétate d'éthyle
- Méthanol
- Ammoniaque concentré et dilué à 10%
- Chloroforme
- Acide sulfurique concentré
- Acide chlorhydrique
- Chlorure ferrique
- Soude 1/10 et 0.2N
- Chlorure ferrique à 3% et 1%
- Poudre de magnésium
- Vanilline
- Alcool chlorhydrique 0.2N
- Ether de pétrole
- Ether éthylique

2. Méthodes : screening phytochimique et test de dégagement larvaire

Screening phytochimique

Principe

Le screening phytochimique est un ensemble de méthodes qui permet de détecter, dans la plante, la présence des substances appartenant à des classes de composés potentiellement physiologiquement actifs : les métabolites secondaires. Suite à un prétraitement de la matière végétale (infusion ou macération), les métabolites secondaires sont extraits de la plante. Ces derniers subissent une réaction spécifique lorsqu'ils sont mis en présence de réactifs chimiques donnés (Dohou et al. 2003). Cette réaction permet ainsi de les mettre en évidence. Il est alors possible à la fin d'un screening phytochimique d'établir une liste des métabolites secondaires présents dans la plante étudiée.

Manipulation

1°) Préparation du matériel végétal

Solution A infusé à 10% soit, 20 g d'organes broyés sont placés dans un erlenmeyer contenant 200mL d'eau bouillante. Boucher l'erlenmeyer et laisser infuser 20 minutes. Filtrer.

2°) Réalisation du screening phytochimique

Recherche des phénols.

➔ Plante témoin : Thym / Manguier

Préparation :

- Solution acide chlorhydrique 0.5N
- Solution chlorure ferrique à 3% : 3g chlorure de fer dans 100ml d'acide chlorhydrique 0.5N

Expérience :

Dans un tube versé 2ml de solution A et 1ml de solution ferrique à 3%

Si le mélange se colore en bleu puis virage au vert, le test est positif

Recherche des flavonoïdes.

→ Plante témoin : pépins de pamplemousse / citron / sapotille / pois d'angle

Préparation :

- Solution d'alcool chlorhydrique : 8v alcool + 2v HCL pur

Expérience :

Dans un tube versé 2ml de solution A, 2ml de solution d'alcool chlorhydrique et 0,2g de poudre de magnésium.

Si le mélange se colore en orange ou rouge, il y présence de flavonoïdes

Recherche des anthocyanes.

→ Plante témoin : calices de groseilles pays / hibiscus

Préparation :

- Solution acide chlorhydrique 2N

Expérience :

Dans un tube versé 2ml de solution A et 2ml de solution d'acide chlorhydrique 2N. Y ajouter 10 à 20 gouttes d'ammoniaque concentrée.

Si le mélange se colore en rose-rouge puis, après l'ajout des gouttes, en bleu-violacé il y présence d'anthocyanes.

Recherche des flavanes.

➔ Plante témoin : nervure principales de feuilles de cacaoyer / quenette / abricot / caïnite / sapotille

Préparation :

- Solution de vanilline à 2% : 2g de vanilline dans 100ml d'acide chlorhydrique concentré.

Expérience :

Dans un tube versé 2ml de solution A et quelques gouttes de solution de vanilline à 2%.

Si le mélange se colore en rouge, le test est positif.

Recherche des proanthocyanidols.

➔ Plante témoin : écorce de Quebracho, feuille de manguier

Expérience :

Dans un tube versez 2ml de solution A et 2ml d'acide chlorhydrique. Dans un bécher mettez la solution au bain marie bouillant (5min)

Si le mélange se colore en rouge, le test est positif.

Recherche des tanins.

➔ Plante témoin : feuille de manguier et d'acacia

Préparation :

- Solution chlorure ferrique à 1% : 1g chlorure de fer dans 100ml d'eau distillée

Expérience :

Dans un tube versé 2ml de solution A et 1ml de solution ferrique à 1%

Si le mélange se colore en bleu-noir ⇔ tanins galliques.

Si le mélange se colore en brun-vert ⇔ tanins catéchiqques.

Recherche des coumarines

Préparation :

- Solution de soude 0.2N : 0,8g NaOH dans 100ml eau distillée

Expérience :

Dans un tube versé 1 à 2g de matériel végétal et 8 à 10ml d'eau distillée (le volume d'eau peut varier en dépit du matériel végétal). Imbiber de soude 0.2N du papier filtre. Placer le papier dans le tube (il ne doit pas être en contact direct avec le matériel végétal). Dans un bain marie, placer les tubes, porter le tout à ébullition.

On observe ensuite les papiers avec une lumière UV. La fluorescence indique un résultat positif.

Recherche des quinones

➔ Plante témoin : senna alata, romarin

Principe :

En milieu acide, les quinones sont extraites par l'éther ou le chloroforme. En milieu alcalin, les quinones libres donnent une coloration allant du rouge au violet.

Expérience :

Peser 5,0g de matériel végétal. Humecter avec 5ml d'acide chlorhydrique N/10. Laisser 2h puis ajouter 50ml de chloroforme. Filtrer puis ajouter 10 ml d'ammoniac dilué au 1/2. Agiter.

L'apparition d'une coloration allant du rouge au violet témoigne de la présence de quinones.

Recherche des dérivés anthracéniques

➔ Plante témoin : feuilles de Cassia alata (Senna alata), romarin

ATTENTION : Utilisation d'une autre préparation du matériel végétal.

Préparation :

Mettre 1,0g de poudre de matériel végétal avec 10ml de chloroforme dans un bécher.
Placer le bécher au bain-marie durant 3 mn et filtrer.

Obtention d'un filtrat (F) et d'une poudre épuisée par le chloroforme (P)

- Les anthracéniques libres (REACTION DE BORNTRAGGER) :

Dans un tube, mettre 1,0ml filtrat (F) + 1ml d'ammoniaque

L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'anthracéniques libres.

- Les anthracénique combinés :

Dans un tube, mettre poudre (P) + 10ml d'eau distillée + 1ml d'acide chlorhydrique.
Chauffer le bécher au bain-marie bouillant pendant 15mn puis filtrer. Prélever 5ml de filtrat, extraire avec 5ml de chloroforme. A la phase organique ajouter 1ml d'ammoniaque dilué à 10%.

L'apparition d'une coloration rouge indique la présence d'anthraquinones sous la forme O-hétérosides.

Stérols et Triterpènes

→ Plante témoin stérols : Huile d'olive

→ Plante témoin triterpènes : épinards, ail.

Expérience :

Evaporer à sec 10mL de solution C. Dissoudre le résidu dans 1ml d'anhydride acétique, puis dans 1ml de chloroforme. Répartir la solution dans 2 tubes à essai. A l'aide d'une pipette ajouter 1ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube sans agiter.

La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence de stérols et triterpènes.

Test de dégainement Larvaire

Ce test est mis en place dans le but de tester l'effet du Lévamisolé sur le dégainement des larves L3 d'*H. Contortus*.

Principe

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

Manipulation

Préparation d'une solution larvaire : Sortir les larves pour les faire revenir à température ambiante (sous agitation constante). Prélevez 10 gouttes de 5µl. Compter les larves dans chaque goutte. Puis à partir du comptage préparer une solution à 2000L3/ml.

Préparation d'une solution de javel à 2,6% de CA : On dispose d'un berlingot 4,8% CA, on établit $V_f = 20,0\text{ml}$.

Soit $\rightarrow \frac{Qtée\ CA\ en\ [g/l](2,6\%)*V_f}{Qtée\ CA\ (4,8\%)} = \text{Volume de javel 4,8\% à prélever}$

Volume PBS à ajouter = $V_f - \text{Volume de javel 4,8\% à prélever}$.

Préparation d'une solution de NaCl/Javel : Dans un bécher ajouter 5,0ml de Javel à 2,6% CA + 5,0ml de NaCl 16,6%

Préparation des dilutions de NaCl/Javel :

- 1/80 : 0,375ml NaCl/Javel + 25,625ml PBS
- 1/100 : 0,25ml NaCl/Javel + 25,75ml PBS
- 1/120 : 0,25ml NaCl/Javel + 29,75ml PBS

- 1/130 : 0,231ml NaCl/Javel + 29,8ml PBS
- 1/140 : 0,215ml NaCl/Javel + 30,0ml PBS
- 1/150 : 0,250ml NaCl/Javel + 37,85ml PBS
- 1/180 : 0,170ml NaCl/Javel + 29,83ml PBS

Test de dilution de Javel : Distribuer 1,0ml dans chaque dilution dans un tube bien identifié puis ajouter sous agitation 1,0ml de solution larvaire. Dans le dernier tub, ajouter 1,0ml de PBS et 1,0ml de solution larvaire. Mettre les tubes sous agitation constante.

Test de dégainement : Dans des ependorfs de 2,0ml bien identifiés, mettre 100,0µl de solution larvaire et 100,0µl de la dilution de javel retenue pour obtenir 100% de dégainement (1/100).

Préparation d'une solution de lévamisole [1mg/ml] : Dans un bécher mélanger 100,0mg de lévamisole + 100,0ml d'eau distillée. (0)

Préparation des dilutions de lévamisole :

1. 0,1mg/ml → 4,0ml lévamisole + 36,0ml eau
2. 0,05mg/ml → 5,0ml (1) + 5,0ml eau
3. 0,01mg/ml → 1,0ml (1) + 9,0ml eau
4. 0,005mg/ml → 5,0ml (3) + 5,0ml eau
5. 0,001mg/ml → 1,0ml (3) + 1,0ml eau

Préparation des tubes :

- a. 1,0ml (1) + 1,0ml de solution larvaire
- b. 1,0ml (2) + 1,0ml de solution larvaire
- c. 1,0ml (3) + 1,0ml de solution larvaire
- d. 1,0ml (4) + 1,0ml de solution larvaire
- e. 1,0ml (5) + 1,0ml de solution larvaire
- f. 1,0ml (eau) + 1,0ml de solution larvaire
- g. 1,0ml (PBS) + 1,0ml de solution larvaire

Agitation pendant 3h

Lavage : Réalisez 3 lavages successifs au PBS via la centrifugeuse. A chaque fin de centrifugation, on récupérer le surnageant t réintroduisez du PBS.

Préparation du test de dégainement : Pour chaque dilution de lévamisole ainsi que pour la concentration à 1mg/ml, réaliser des ependorfs de 2,0ml soit, 100,0µl de dilution + 100,0µl de solution larvaire. Les ependorfs sont agitations constantes. La réaction est arrêtée pour chaque dilution avec du lugol : x1 à 10min ; x2 à 30min ; x3 à 70min ; x3 à 80min.

Comptage : Comptez le nombre de larves gainées et le nombre de larves dégainées.

Calcul

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

Résultats & Discussions

1. Screening photochimique

Témoin (T)	Mélange 2 (M2)	Mélange 1 (M1)	
3	3	3	Phénols
0	0	0	Tanins catéchique
2	3	3	Tanins Gallique
3	2	2	Flavonoïdes
3	2	2	Flavanes
3	0	0	Anthocyanes
3	3	2	Proanthocyanidols
0	1	1	Coumarines
3	2	2	Quinones
2	0	0	Anthracéniques libres
0	0	0	Anthracéniques combinés
1	0	0	Stérols
1			Triterpènes

Les résultats des screenings phytochimiques réalisés montrent que :

Phénols : M1 et M2 sont riches en phénols.

Tanins : M1 et M2 possèdent uniquement des tanins galléiques.

Flavonoïdes : M1 et M2 sont riches en flavonoïdes.

Flavanes : M1 et M2 possèdent des flavanes en quantité moyenne.

Anthocyanes : M1, M2 et T sont dénués d'anthocyanes.

Proanthocyanidols : M1 possède une quantité moyenne de flavanes. M2 et T en sont riches.

Coumarines : M1 et M2 sont pauvres en coumarines. Le témoin en est dénué, peut-être n'était-il pas suffisamment concentré.

Les 2 échantillons des mélanges de plantes évalués pour la présence de métabolites secondaires contiennent donc la même nature de métabolites secondaires. Les échantillons sont plus riches en polyphénols avec la classe des proanthocyanidols (ou tanins condensés) qui est prédominante.

Figure 4. Tableau de résultats du screening phytochimique

2. Test anthelminthique sur Lévéamisole

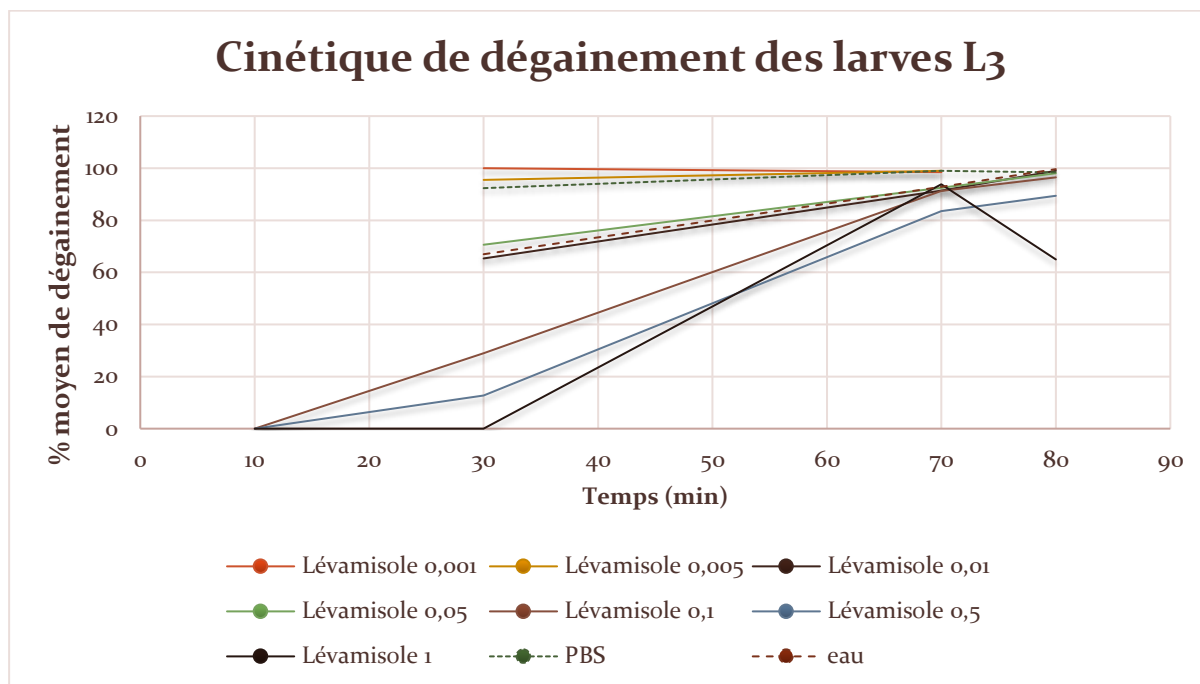


Figure 5. Evolution du dégagement des larves L₃ d'*H. contortus* en fonction de la concentration en Lévéamisole (mg/mL).

Le PBS est notre témoin négatif, il traduit l'évolution « normale » des larves lors du dégagement. On remarque que le % de larves dégainées du témoin PBS est de 92% dès 30 min et évolue de manière linéaire et croissante jusqu'à $t = 80$ min. On observe la même tendance mais plus lente pour le témoin négatif dans l'eau (67% à 30 min).

Concernant le Lévéamisole testé, on observe globalement un effet dose. Dès 30 min, un effet significatif comparativement au témoin PBS est observé à partir de la concentration 0.01mg/ml ; et comparativement au témoin eau, à partir de la concentration 0.1 mg/ml.

On observe globalement un ralentissement du dégagement avec le Lévéamisole, comparativement aux témoins négatifs. Cependant, entre 70min et 80min le dégagement pour la concentration à 1 mg/ml décroît, ce qui est impossible, il y a donc probablement une erreur au niveau du comptage à 70 min.

Ainsi, les résultats à 80 min seront utilisés pour la comparaison d'efficacité (figure 6) pour lequel le témoin atteint 100% de dégagement (eau et PBS).

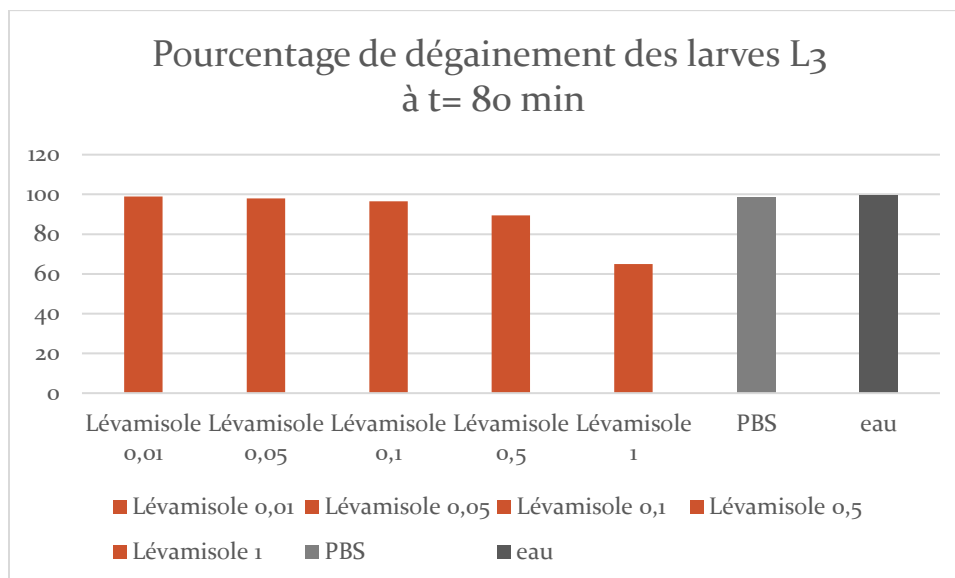


Figure 6. Evolution du dégagement des larves L3 aux différentes concentrations de lévamisole (mg/ml), comparées aux témoins négatifs eau et PBS à t=80 min.

A t=80 min, on observe un effet dose avec un effet significatif du lévamisole entre 0.5 et 1 mg/ml comparativement aux témoins négatifs. C'est donc cet intervalle de concentration qu'il faut prendre comme témoin positif.

Conclusion

L'objectif du travail était de contribuer à l'étude de l'évaluation de 2 mélanges de plantes par : la mise en évidence des classes chimiques présentes dans les extraits à évaluer ; et par l'évaluation de l'effet du témoin positif Lévarnisole sur le dégagement du parasite au stade L3 en vue d'une utilisation pour de futurs tests des mélanges.

D'une part nous avons pu déterminer qualitativement les molécules présentes dans les 2 mélanges de plantes. La majorité des composés recherchés sont présents dans les 2 mélanges, avec une prédominance de polyphénols dont majoritairement la classe des proanthocyanidols (ou tanins condensés).

D'autre part, nous avons pu déterminer à t=80 min un intervalle de concentrations en Lévarnisole comprises entre 0.5 et 1 mg/ml pour une future utilisation comme témoin positif.

Il s'agira par la suite, de poursuivre les travaux en affinant le temps de dégagement et la concentration cible pour le témoin Lévarnisole.

Références bibliographiques

Amarante, a. F. T., pomroy, w. E., charleston, w. A. G., leathwick, d. M. Et tornero, m. T. T. (1997). Evaluation of a larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in *Ostertagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology* 27, pp 305–311.

Anne Couderc. Tolérance et efficacité d'un traitement par lévamisole et mycophénolate mofétil dans le syndrome néphrotique idiopathique de l'enfant. *Médecine humaine et pathologie*. 2016. ffdumas01310497f

Bell E. A. (1980) : The physiological role(s) of secondary (natural) products. In : The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol 7. Secondary plant products. Conn E. E. (Eds.), Academic Press, 1-20.

Charvet C.L., Courtot E., Harmache A., Guegnard F., Neveu C.1 1 INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly. Nouvelles approches pour le contrôle des parasites résistants aux vermifuges. *Innovations Agronomiques* 66 (2018), 1-8

Chrétien, Aline. Cinétique comparée des phénomènes physiopathologiques et de la réponse immune chez des ovins résistants (Martinik Black Belly) ou sensibles (Lacaune) au cours d'une primo-infestation par *haemonchus contortus*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2011, 157 p.

Hernández-Castellano, L.E., Nally, J.E., Lindahl, J., Wanapat, M., Alhidary, I.A., Fanguero, D., Grace, D., Ratto, M., Bambou, J.C., de Almeida, A.M., 2019, Dairy science and health in the tropics: challenges and opportunities for the next decades. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 1009-1017.

J. MOYROUD, J. BREUIL, P. COULANGES. Essai d'une forme galénique nouvelle du levamisole (solaskil) dans le traitement de l'ankylostomiase et de l'ascaridiase à Madagascar. *Arch.Inst. Pasteur Madagascar*. 1982 (1983), 50, 1

Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012, An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70-78.

Paul Hannewald, Frédéric Bourgaud, Jean-Paul Fèvre. 29 mars 2017. La technologie des « plantes à traire » pour la valorisation des plantes rares.

Rhodes M. J. C. (1994) : Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.*, 24, 1-20.

Sabrina Krief. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. *Sciences du Vivant [q-bio]*. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2003. Français. fftel-00006170f

Annexe

 Centre Antilles-Guyane		Unité : Unité de Recherches Zootechniques Service/équipe : cellule parasitologie du laboratoire Nature du document : MODE OPERATOIRE
Coproculture et récolte des larves infestantes des Strongles Gastro-intestinaux (SGI)		
Rédigé par : M. Mahieu	Code : MO-PAR-004	Nombre de pages : 3
Revu par : utilisateur	N° Version : 1	
Validé par : N. Mandonnet	Emis le : 25/02/05	
Destinataires : tt agent laboratoire	Modifiée le :	

1. Objet et domaine d'application

En Parasitologie, technique permettant le développement des œufs de SGI présents dans les fèces d'animaux parasités, en vue de leur identification au stade L3 (niveau du genre) et de leur comptage (détermination du rapport quantitatif entre les genres), ou pour permettre d'infester expérimentalement des animaux.

2. Hygiène et sécurité

Port de gants latex recommandé.

3. Principe de la méthode

A température ambiante (Antilles) les œufs de strongles gastro-intestinaux se développent en larves infestantes L3 en 7-8 jours, dans les fèces, si l'humidité et l'aération ne sont pas limitantes. Les L3 sont très mobiles et se déplacent dans le film d'eau à la surface des objets humides, de façon à se disperser autour des fèces puis à se positionner sur l'herbe en attendant d'être ingérée par un herbivore hôte potentiel.

4. Matériels nécessaires

Boîtes de Petri Ø 140 mm

Appareil de Baermann : passoire plastique + entonnoir + tube à fond conique adapté à l'entonnoir + support

Trompe à eau

Papier essuie-main

Étiquettes autocollantes

5. Contraintes de la méthode

Mettre les fèces en culture le jour du prélèvement, **sans les stocker au froid.**

Aérer et humidifier si nécessaire chaque jour

Extraire les larves 3 en Baermann **7 à 10 jours après mise en culture.**

Ne pas exposer au soleil.

1. Contenu du mode opératoire

Coproculture

Si les prélèvements fécaux ont été fait avec microlax TM, laver les fèces sous un filet d'eau pour éliminer le microlax TM.

Placer des fèces fraîches dans une boîte de Petri identifiée (date prélèvement, lot, boîte...), sans tasser, à l'ombre et à température ambiante (+/-25°C), pendant 7 (minimum) à 10 jours (maximum). Maintenir humide sans excès (pas d'eau libre au fond de la boîte). Aérer chaque jour (en agitant la boîte).

Dans le cas d'une production massive de larves:

Placer les fèces dans un panier plat à mailles fines, en couche mince (3 cm), sans tasser, et appliquer les mêmes règles que ci-dessus

Récolte – extraction des L3

Préparer l'appareil de Baermann (identification du tube conique, ajustement à l'entonnoir)

Garnir la passoire d'une feuille de papier essuie-main (une seule épaisseur de papier)

Placer l'appareil sur son support, placer les fèces dans la passoire, couvrir d'eau.

Laisser reposer une nuit. Les L3 ont sédimenté au fond du tube conique.

Retirer la passoire.

Enlever l'eau à la trompe, jusqu'en haut de la partie conique du tube, sans perturber le culot de L3. Détacher le tube de l'entonnoir et le fermer avec un bouchon.

Stocker au frais (4 à 6°C) jusqu'à lecture.

Dans le cas d'une production massive de larves:

- Extraction des larves

Placer le panier plat à mailles fines contenant les fèces dans un récipient étanche plus grand, en le surélevant légèrement par rapport au fond (0.5-1 cm). Recouvrir d'eau, laisser une nuit.

- Sédimentation des larves

Retirer le panier et les fèces. Récupérer l'eau contenant les L3 en rinçant soigneusement, puis sédimenter dans un Baermann si le volume n'est pas excessif (en filtrant avec une feuille d'essuie-main s'il y a des particules en suspension).

Si le volume de liquide est trop important, le récupérer dans un contenant haut et étroit (bécher, bouteille, éprouvette...) et laisser décanter plusieurs heures. Réduire le volume à la trompe à vide pour pouvoir sédimenter au Baermann (penser au volume d'eau de rinçage).

Récupérer le tube conique identifié comme ci-dessus.

Si nécessaire, le montage de Baermann habituel peut être remplacé par un grand entonnoir muni d'un tube FalconTM de 50 ml.

Si les L3 récupérées doivent servir à des infestations expérimentales, il est recommandé de les stocker ensuite au frais, dans des tubes FalconTM ou des bouteilles pour culture à moitié remplis d'eau du robinet et disposés à plat.

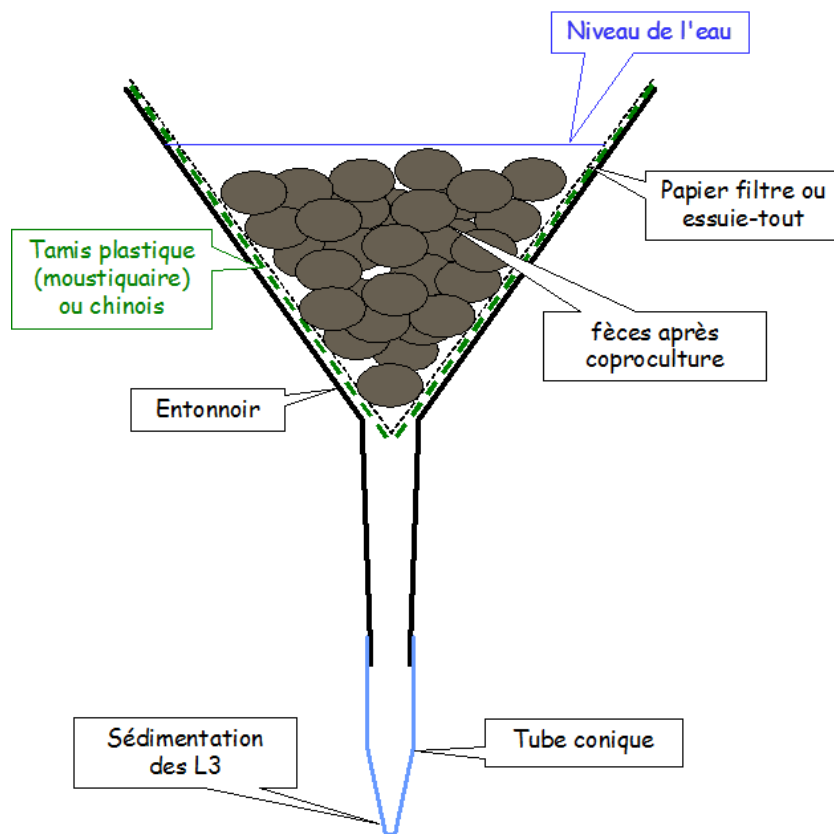


Schéma appareil de Baermann pour
extraction des L3

Résumé

Les strongles gastro-intestinaux sont des vers parasites du tube digestif que l'on retrouve généralement chez les bovins, les caprins et les ovins. Le lévamisole est une molécule anthelminthique utilisée sous différentes formes dans le but de bloquer le dégainement des vers, c'est-à-dire bloquer le passage du stade L3 (non-infestante) au stade L4 (infestante). Néanmoins, l'utilisation répétitive de cette molécule a fait naître une résistance chez les parasites.

Les métabolites secondaires de certaines plantes tropicales ont un pouvoir anthelminthique. Le stage effectué s'articule autour de cette propriété. Ainsi, à partir de mélange de plantes nous avons mis en évidence de manière qualitative et quantitative ces molécules d'intérêts. De plus, nous avons cherchés une concentration en lévamisole où 100% des larves sont gainées à un temps précis. Cette dernière expérience permettra par la suite d'évaluer le pouvoir anthelminthique des molécules cibles ainsi que, plus généralement, celui des plantes tropicales.

Abstract

Gastrointestinal strongles are parasitic worms of the digestive tract that are generally found in cattle, goats and sheep. Levamisole is an anthelmintic molecule used in various forms to block the drawing of worms, that is to say to block the passage from stage L3 (non-infesting) to stage L4 (infesting). However, repetitive use of this molecule has led to resistance in parasites

The secondary metabolites of some tropical plants have an anthelmintic power. The intership revolves around this property. Thus, from a mixture of plants we have qualitatively and quantitatively highlighted these molecules of interest. In addition, we looked for a levamisole concentration where 100% of the larvae are sheathed at a specific time. This latest experiment will then evaluate the anthelmintic power of the target molecules as well as, more generally, that of tropical plants.