



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :** *Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)*

**Discipline ou spécialité :** *Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition*

---

**Présentée et soutenue par** *Foteini MANOLARAKI*

---

**Le :** *21 Janvier 2011*

---

### Titre :

*Propriétés anthelminthiques du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) : Analyse des facteurs de variations et du rôle des composés phénoliques impliqués*

---

### JURY

*M Michel FRANC - Professeur en Parasitologie à l'ENVT Toulouse  
M Hervé HOSTE - Directeur de Recherche à l'INRA Toulouse  
M Pierre MORAND-FEHR - Directeur de Recherche à l'INRA -AgroParistech  
Mme Carine PARAUD- Docteur en Parasitologie à l'Anses  
M Dieter TREUTTER - Professeur à l'Université de Munich  
M Lionel ZENNER - Professeur à VetAgro Sup de Lyon*

---

**Ecole doctorale :** *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (ED 458)*

**Unité de recherche :** *UMR 1225 INRA/DGER Interactions Hôte-Agent Pathogène*

**Directeur(s) de Thèse :** *M le Dr Hervé HOSTE*

**Rapporteurs :** *M le Dr Pierre MORAND-FEHR - Directeur de Recherche à l'INRA -AgroParistech  
M le Pr Lionel ZENNER - Professeur à VetAgro Sup de Lyon*

Cette thèse est dédiée à mes parents, Despina et Konstantino Manolaraki

Cette thèse représente l'aboutissement de l'amour, du soutien et de la confiance qu'ils m'ont montrés pendant toutes ces années de ma vie.

La dédicace de ce manuscrit exprime mes sincères remerciements pour toutes les choses qu'ils m'ont données jusqu'à maintenant.

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr. Hervé Hoste de l'équipe „Interaction Tanins-Nématodes Digestifs' de l'UMR 1225 INRA/DGER „Interactions Hôte-Agent Pathogène', pour avoir dirigé mes travaux de recherche. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour son aide, ses conseils et son soutien pendant toutes ces années. Je tiens à le remercier pour sa disponibilité, sa patience, et la bienveillance qu'il m'a témoignée dès le premier jour. J'ai appris de lui qu'un bon professeur doit d'abord être humain.

Je souhaite remercier le Dr. Pierre Morand-Fehr de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Paris (AgroParistech) et le Pr. Lionel Zenner de VetAgro Sup de Lyon d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Pr. Michel Franc de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, au Dr. Carine Paraud de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, au Pr. Dieter Treutter de l'Université de Munich qui ont bien voulu faire partie de mon jury de thèse.

➤ Je souhaite remercier le Dr. Smaradga Sotiraki du „National Agricultural Research Foundation' de Thessalonique qui a bien voulu faire partie de mon comité de thèse. Je tiens également à la remercier pour la confiance qu'elle m'a montrée depuis le début, pour son encouragement et ses conseils utiles sans lesquels tout serait plus difficile. Mais tout d'abord je la remercie d'être mon amie.

Cette étude a pu être réalisée grâce à l'appui et à la collaboration de nombreuses personnes, tant en France qu'à l'étranger. Je tiens donc également à remercier :

➤ Les membres de l'équipe „Interaction Tanins-Nématodes Digestifs' présents au cours des quatre dernières années ! Séverine Brunet, Miguel Alonso-Diaz, Cintli Martinez-Ortiz-de-Montellano, Nadia Ojeda-Robertos, Eric Pardo, Eric Azando, Edgard Franco-Gomes, Juan Jose Vargas-Magana, Celia Arroyo-Lopez, Marine Debouchaud, Angélique Serre, Marie-Emmanuelle Sanchez. Je tiens à vous remercier pour votre amitié et pour le temps passé ensemble à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire. Le contact avec vous m'a fait réaliser que dans toutes les parties du monde on peut trouver des personnes avec qui communiquer et passer du bon temps. Je suis très heureuse de vous avoir rencontrés et d'avoir partagé avec vous des sentiments et des expériences.

- Le Pr. Michel Franc et le personnel du département de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour m'avoir accompagnée au quotidien pendant ces années.
  
- Le Pr. François Schelcher et le personnel de l'UMR 1225 INRA/DGER „Interactions Hôte-Agent Pathogène' pour leur sympathie et les services rendus.
  
- L'équipe de l'UMR 152 IRD/UPS „Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox' et l'équipe de l'UMR 1225 IHVV „Interactions Hôtes Virus et Vaccinologie' pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire avec amitié et gentillesse.
  
- Les secrétaires de l'UMR 1225, Michèle Serthelon, Marie Perrin, Corrine Fabreguette et Laurence Lecomte pour leur amitié et leur aide au niveau administratif.
  
- Le Pr. Dieter Treutter de l'Université de Munich „Technische Universität München', le Dr. Irene Mueller-Harvey du „Department of Agriculture' de l'Université de Reading', le Pr. Karl Stich et le Dr. Heidi Halbwirth de l'„Institute für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften', de l'„Université de Vienne, le Dr. Jocelyne Aufrère du centre INRA de Theix, le Dr. Wilbert Pellikaan du „Department of Animal Nutrition' de l'Université de Wageningen, le Dr. Lydia Smith du „National Institute of Agricultural Botany' à Cambridge pour m'avoir fourni les échantillons, les analyses biochimiques mais également pour leur intérêt pour mon travail et leur disponibilité. Je veux remercier également Ionela Regos, Elisabetta Strigano, Katerina Theodoridou, Mila Domenis, Christine Hayot pour leur aide pendant ma thèse.
  
- Le Dr. Alexandros Stefanakis et le Dr. Manousos Volanis du „NAGREF-Subtropical Plant and Olive Tree Institute' de Chania pour m'avoir fourni des échantillons et pour leur aide pendant l'expérience *in vivo*.
  
- La Société Caussade Semences pour m'avoir offert les échantillons pendant trois années consécutives. Je tiens à les remercier pour leur collaboration et leur aide précieuse.
  
- Le Dr. Sofia Belibasaki (thia Sofia) pour son soutien, son encouragement et la confiance qu'elle m'a témoignée dès le premier jour de notre rencontre. Elle est la personne qui m'a montré le chemin de ma future carrière.

➤ Le Dr. Vassilia Theodorou, une chercheuse reconnue, mais surtout une personne pleine de gentillesse et de générosité. Elle et sa famille m'ont accueillie depuis le premier jour de mon séjour en France. Ils m'ont fait sentir comme ayant une autre famille à Toulouse. Un grand merci pour votre soutien et votre amitié.

➤ Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement ma sœur Haroula pour le soutien et les soins qu'elle m'a offerts pendant mon premier séjour en France, ce qui m'a donné la force de continuer. Un immense merci pour toute l'aide quotidienne.

➤ Mes parents pour leur amour, leur soutien, leur confiance en moi. Sans votre aide, je n'aurais rien pu faire. Je vous exprime ici un profond merci pour toutes les choses que généreusement vous m'avez données.

➤ Thanasis, un homme qui a marqué, marque et marquera ma vie. Sa compréhension et son soutien dans toutes les étapes dans la vie sont les guides de ma réussite. Un profond merci pour toutes les choses qui m'a donné toutes ces années de notre chemin commun.

Je remercie aussi tous mes amis et tous mes proches qui, chacun à sa manière, de près ou de loin, m'ont soutenue durant ma vie.

Enfin, notre travail de thèse a été réalisé grâce au soutien financier de :

➤ L'Union Européenne, par le projet Marie-Curie „Healthy Hay’ (Projet MRTN\_CT-2006-035805)

➤ COST Action FA0805 (Goat-parasite Interactions : from knowledge to control CAPARA)

## TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>3</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Les nématodes gastro-intestinaux des ruminants</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1. Généralités sur les nématodes gastro-intestinaux</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2. Cycle biologique</b> .....	<b>17</b>
1.2.1. La phase libre.....	17
1.2.2. La phase parasitaire.....	17
<b>1.3. Biologie des larves infestantes</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4 Conséquences des strongyloses gastro-intestinales chez les ruminants</b> .....	<b>19</b>
1.4.1. Impact sur les productions.....	19
1.4.2. Tableau clinique des strongyloses gastro-intestinales.....	20
<b>1.5. Mécanismes physiopathologiques et pathogéniques</b> .....	<b>20</b>
1.5.1. Effets sur la pathologie digestive.....	20
1.5.1.a. Diminution de l'ingestion.....	20
1.5.1.b. Maldigestion et malabsorption.....	21
1.5.1.c. Modification et réorientation des métabolismes.....	21
1.5.2. Les mécanismes pathogéniques.....	22
1.5.2.a. Les effets mécaniques.....	22
1.5.2.b. Effets des produits d'excrétion-sécrétion.....	22
<b>2. Les anthelminthiques de synthèse et leurs limites</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1. Classification des anthelminthiques de synthèse</b> .....	<b>23</b>
2.1.1. Les benzimidazoles et les pro-benzimidazoles.....	23
2.1.2. Imidazothiazoles et Tétrahydropyrimidines.....	25

2.1.3. Les lactones macrocycliques.....	25
2.1.4. Le monepantel.....	25
<b>2.2. Limites d'utilisation des anthelminthiques de synthèse.....</b>	<b>26</b>
2.2.1. Restrictions d'emploi des anthelminthiques.....	26
2.2.2. Ecotoxicité des anthelminthiques.....	26
2.2.3. Résistance des nématodes gastro-intestinaux aux anthelminthiques.....	27
2.2.3.a. Facteurs favorisant l'apparition des résistances.....	27
2.2.3.b. Facteurs intrinsèques.....	27
2.2.3.c. Facteurs extrinsèques.....	28
2.2.3.d. Distribution géographique mondiale.....	28
2.2.3.e. Espèces animales en cause.....	28
2.2.3.f. Espèces parasites concernées.....	29
2.2.3.g. Familles d'anthelminthiques concernées.....	29
2.2.3.h. Mécanismes des résistances aux anthelminthiques.....	29
<b>3. Les méthodes alternatives aux anthelminthiques de synthèse.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Réduire les sources de contamination des animaux.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Améliorer la résistance de l'hôte.....</b>	<b>31</b>
3.2.1. La vaccination.....	31
3.2.2. La sélection d'animaux génétiquement résistants.....	32
3.2.3. L'amélioration de la ration de l'hôte.....	32
<b>3.3. Eliminer les nématodes gastro-intestinaux.....</b>	<b>33</b>
3.3.1. Les plantes à propriétés anthelminthiques.....	33
<b>4. Les tannins.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Généralités et définition.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2. Classification biochimique des tannins.....</b>	<b>35</b>
4.2.1. Les tannins hydrolysables.....	36
4.2.2. Les tannins condensés.....	36

4.2.2.a. Structure biochimique des flavan -3 ols.....	38
4.2.2.b. Structure biochimique des polymères.....	39
4.2.2.c. Biosynthèse des tannins condensés.....	40
<b>4.3. Propriétés des tannins.....</b>	<b>41</b>
4.3.1. Propriétés physico-chimiques des tannins.....	41
4.3.1.a. Solubilité.....	41
4.3.1.b. Formation de complexes avec des protéines.....	42
4.3.2. Propriétés biologiques des tannins.....	43
4.3.2.a. Inhibition des enzymes.....	43
4.3.2.b. Activité anti-oxydante.....	43
4.3.2.c. Effet antiseptique.....	43
<b>4.4. Les plantes riches en tannins.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5. Rôle des tannins chez les plantes.....</b>	<b>44</b>
<b>4.6. Localisation des tannins dans les tissus végétaux.....</b>	<b>44</b>
<b>5. Effets des tannins chez les ruminants non-parasités.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1. Effets des tannins hydrolysables.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2. Effets des tannins condensés.....</b>	<b>45</b>
5.2.1. Absence d'effet sur l'ingestion volontaire d'aliments.....	46
5.2.2. Effets sur la digestion des aliments.....	46
5.2.3. Amélioration des productions.....	47
5.2.4. Effets sur la santé des animaux.....	48
<b>5.3. Effets néfastes des tannins condensés.....</b>	<b>48</b>
5.3.1. Réduction de l'ingestion volontaire des aliments.....	49
5.3.2. Effets sur la physiologie digestive.....	49
5.3.3. Effets négatifs sur les paramètres zootechniques.....	50
<b>6. Effets des tannins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux, parasites des ruminants.....</b>	<b>50</b>



<b>6.1. Etudes <i>in vitro</i> : mises en évidence des effets AHs.....</b>	<b>51</b>
6.1.1. Extraits totaux de plantes légumineuses.....	52
6.1.2. Extraits de plantes ligneuses tempérées.....	52
6.1.3. Extraits de plantes tropicales.....	52
<b>6.2. Rôle des tannins dans les effets AHs constantes.....</b>	<b>53</b>
6.2.1. Emploi d'inhibiteurs de tannins.....	53
6.2.2. Effets de tannins condensés purifiés.....	53
6.2.2.a. Extraits de quebracho.....	53
6.2.2.b. Tannins purifiés.....	54
6.2.3. Monomères des tannins condensés.....	54
<b>6.3. Etudes en condition d'infestations expérimentales.....</b>	<b>54</b>
6.3.1. Effets sur les larves 3 infestantes.....	54
6.3.2. Effets sur les vers adultes.....	55
<b>6.4. Effets sur la résilience des animaux.....</b>	<b>57</b>
<b>6.5. Modes d'action des tannins condensés sur les Nématodes gastro-intestinaux.....</b>	<b>57</b>
6.5.1. Effet indirect des tannins condensés.....	58
6.5.2. Effet direct des tannins condensés.....	58
<b>7. Variabilité des effets des tannins condensés.....</b>	<b>59</b>
<b>7.1. Facteurs liés à l'hôte.....</b>	<b>59</b>
<b>7.2. Facteurs liés aux nématodes gastro-intestinaux.....</b>	<b>60</b>
7.2.1. L'espèce parasite.....	60
7.2.2. Le stade parasitaire.....	61
<b>7.3. Facteur liés aux sources de tannins condensés exploitées.....</b>	<b>61</b>
7.3.1. La quantité de tannins condensés.....	61
7.3.2. La qualité des tannins condensés.....	62
7.3.3. Implication de ces facteurs sur le mode de distribution des tannins condensés.....	63
<b>7.4. Facteur de variation de la teneur en tannins.....</b>	<b>63</b>
7.4.1. L'espèce végétale et la variété.....	63

7.4.2. La partie végétale.....	64
7.4.3. Le stade végétal.....	64
7.4.4. Les conditions environnementales.....	64
<b>ETUDE PERSONNELLE.....</b>	<b>67</b>
<b>LES OBJECTIFS.....</b>	<b>68</b>
<b><u>CHAPITRE 1</u>.....</b>	<b>69</b>
“Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes” Manolaraki et al, 2010, Parasitology 137(4) : 685-96.	
<b><u>CHAPITRE 2</u>.....</b>	<b>82</b>
“Variability of the in vitro AH activity of sainfoin ( <i>Onobrychis viciifoliae</i> ) related to environmental factors”	
<b><u>CHAPITRE 3</u>.....</b>	<b>108</b>
“Variability of the in vitro AH activity of sainfoin ( <i>Onobrychis viciifoliae</i> ) related to different varieties”	
<b><u>CHAPITRE 4</u>.....</b>	<b>129</b>
“Compared in vitro anthelmintic activity of different conservation methods of sainfoin (fresh, hay, silage): Possible role of flavonoid glycosides and aglycones”	
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSIONS / PERSPECTIVES.....</b>	<b>159</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>161</b>

## RESUME

Les nématodes parasites du tube digestif demeurent une contrainte majeure pesant sur la santé, le bien être et les productions des petits ruminants élevés à l'herbe. Le mode usuel de maîtrise de ce parasitisme repose sur l'emploi répété de molécules chimiques anthelminthiques. Toutefois, le développement et la diffusion généralisée de résistances à ces molécules dans les populations de vers imposent désormais d'utiliser ces traitements avec discernement et de trouver des solutions complémentaires ou alternatives. L'incorporation dans la conduite d'élevage (ration des moutons ou des chèvres) de légumineuses fourragères riches en tannins condensés dotées de propriétés anthelminthiques s'est avérée une option prometteuse pour réduire le recours aux molécules chimiques. Toutefois, une des difficultés d'application de ces plantes tient à la variabilité des résultats observés. En prenant le sainfoin comme modèle de légumineuse contenant des tannins et en s'appuyant essentiellement sur des méthodes *in vitro* basées sur les larves 3 infestantes, l'objectif général de cette thèse est d'analyser le rôle respectif de facteurs liés à l'environnement, aux variétés génétiques ou aux modes de préservation technologiques sur les propriétés anthelminthiques. Quelque soit le critère envisagé, une forte variabilité a été observée. Les principales variations liées à l'environnement dépendaient de l'année et du cycle de coupe, ainsi que du site d'exploitation. Parmi les 38 variétés testées, 9 se sont avérées à forte activité AH, alors que 22 étaient à très faible activité. Enfin, les résultats ont aussi surtout souligné une plus forte activité antiparasitaire dans des formes séchées ou ensilées par comparaison à des échantillons frais. La comparaison des profils biochimiques liés à cette variabilité a permis une exploration des composés phénoliques expliquant l'activité anthelminthique. L'existence d'une relation dose-réponse a été précisée. Le rôle des tannins condensés a été confirmé, notamment ceux à faible degré de polymérisation et à faible poids moléculaire. L'importance des prodelphinidines qui seraient plus actives que les procyanidines reste à confirmer. De plus, il a été montré que d'autres flavonoïdes peuvent jouer un rôle, notamment les flavan-3-ols et les flavonols. La différence d'activité entre les échantillons de sainfoin ensilés ou fanés par comparaison aux échantillons frais s'expliquerait en partie par la présence de formes non glycosidés de flavonols. Ces résultats devraient conduire à développer des méthodes de dosage pour identifier les échantillons de sainfoin, et plus généralement de légumineuses riches en tannins, dotés de propriétés anthelminthiques significatives.

## ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes remain a major constraint on the health, welfare and production of small ruminants. Over the past decades, the usual mode of control of this parasitism has mainly relied on the repeated use of chemical anthelmintics. However these treatments are nowadays facing some limits among which the most important is the development and widespread diffusion of resistance to these chemical molecules within worm populations. Consequently, the need to find complementary or alternative solutions is becoming urgent. The possible exploitation of forage legumes, rich in condensed tannins, with anthelmintic properties, by incorporation in the diet of sheep or goats, seems a promising option to reduce the reliance on chemical molecules. However, one of the main difficulties to use these plants as nutraceuticals relates to the variations in results. By using sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) as a model of tannin-containing legume and based on *in vitro* methods on the infective third stage larvae, the main objectives of this PhD were i) to examine the influence of environmental, genetic (40 different varieties) and technological (mode of preservation) factors on the anthelmintic properties of sainfoin and ii) to analyse whether differences in phenolic compounds might explain the variations. Whatever the factor considered, a high variability in results was observed. The main variations due to the environmental factors depended on the year and the cycle of cutting, as well as on the site of cultivation. Among the 38 varieties tested, only 9 have shown AH activity over 50 %. Last, a higher antiparasitic activity was found in the dried or ensiled forms compared to the fresh samples. A comparison of the biochemical profiles associated with these variations indicated a role of proanthocyanidins plus other phenolic compounds in the anthelmintic properties. The dose-response relationship between the AH activity and the ability to form complex with proteins was defined. The role of condensed tannins was confirmed, particularly those with a low degree of polymerization. The respective importance of prodelphinidins vs procyanidins remains to be further investigated. Moreover, the possible role of other flavonoids, in particular of flavan-3-ols and flavonols was also confirmed. The difference in activity between dried or ensiled forms compared to fresh sainfoin samples was partly explained by the presence of flavonol aglycosides. These results should favour the development of measurements in order to identify sainfoin samples with higher anthelmintic properties.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γαζοξυλινολινοειδή παξάξηρα απννεί νύλ έλα κεγάλ πξόβν εκα γηα ηελ πγεία, ηελ επεκεξία θαζώο θαη ηελ κείωζε ην παξαγωγηό ζηα κηθξά κπεξαζηνθά. Μέρξη ηελ πξόζθαθα ε αλκεηώπηζε ηωλ παξαζηηώζεωλ βαζίδνληαλ ζηελ επαλακβαλόκελε ρήζε ηωλ αλζει κηζηώλ. Σηελ εκέξσο και αππύο ν ηξόπνο ει έγρνπ αλκεηώπηζε θαπνππο πεξηνξίζκ νύο θπεξίωο ι όγω ηο εκθαλίζεο ο ηπ θαηκκέλπ ηο αλζει κηζναληρής, δεη αδή ηο αλάπηημο αλήζηαζεο ηωλ παξάζηηωλ απέλαληη ζηα αλζει κηζηά. Επνκέλω ε νξίζην νηρή ρήζε ηωλ αλζει κηζηώλ θαζώο θαηε αλάγθε γηα εύξεζε ζπκπλεξκαηώλ ή ελαιαθηώλ ηξόπωλ αλκεηώπηζεο ηωλ παξάζηηωλ είλαη επηηηθή. Η έληαη ηωλ βηγελεξγώλ θπηώλ, πηνύζηα ζε ζπκπθωκέλω ηαλλίλω (condensed tannins) ζηελ δωίθή παξαγωγή (π.ρ. ελζωκ άηωζε ζην ζηξξέζην ηωλ απνπξνβάρηωλ) θαίλεηα λα είλαη πνιύ άππνζρόκελε, πξνθευκένπ λα κηωζεί ε ρήζε ηωλ ρεκηώλ. Ωζηόζν, και από ηη δπζθηνίο ζηελ έληαη απηωλ ηωλ θπηώλ ζηελ πξάμη ζρεηδερηκε ηελ κεγάε παξαιαθηήζηα απνπεί έζκαηα. Παίξνληαο ζα κηηεί ν ην sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*), ελα βηγελεξγό θπηό πηνύζηα ηαλλίλω, θαηρξεζηκνπνύληαο θπεξίωο κεζόδνπ *in vitro* πνπ βαζίδνληαη ζηελ ρήζε κηζκαηώλ πξνλύκθωλ ηξίηη ζηαδίοπ, ν βαζηθό ζθηπό ηο παξνύζεο δπαηξίβήο είλαηε αλάηζε ηπξίοπ ηωλ πεξίβαηνληώλ ζπλζεώλ, ηο επίδξαζεο ηπ γελόηηππ θαη ηωλ ηερνννιγώλ ηξόπωλ ζπληήξεζεο ζηελ αλζει κηζηή ηήηεηα. Τα απνπεί έζκαηα έδεηαλ κεγάε παξαιαθηήηεηα, ζε κηωλνληαο όηη ηα μεθάθα ηλζακέλα δείγμαηα ηπ sainfoin είλαλ κεγαί ύξεε αληπαξαζηηή δξάζε ζε ζρέζε κε ηα θξέζε. Μία ζύκθεζε ηπ βηρκεηώλ πξνθίηηωλ δεικάλωλ έδεηε όηη νηθαηνί ηέο ελώζεη θαίλνηα λα ζρεηδερηκε ηελ αλζει κηζηή δξαζηεηήηεηα θαηόηη κηα απηώλ ππάρρηζρε έζε δόζεο-απνπεί έζκαηο. Ο ξόο ηωλ ζπκπκωκέλωλ ηαλλίλωλ, επηβεβαίωζε θαηηπγί επηηκεξέζεηα νηηξνει θηηίλω θαίλνηα ηα είλαη ηηναπνπεί έζκαηέο θαη ηωλ παξάζηηωλ από νηηηπξνθπηώλωλ ηαλλίλω. Ο βαζκόο πνπ κηωζκ νύ ηωλ ηαλλίλωλ θαζώο θαηηπ κνξθό ηπ νβάρηο θαίλεηα λα επηέάδε ηελ απνπεί έζκαηήηεηα ηπ καιο θαη ηα κηξόξεηα κόζηα ζπκπίηηηα κε κεγαί ύξεε αλζει κηζηή δξάζε. Επηη ένλ ν πηξάλόο ξόο ηωλ θηαβνλνεψώλ, ζπκπεξηακβαλκέλωλ ηωλ θηαβαλ-3-νίωλ επηβεβαίωζε. Η δπαθηζά πνπ παξαηξεξήζεθε ζηε δξάζε κηαμώλ ή ηλζακέλωλ δεικάλωλ θαη θξέζε ηωλ ελκέξε ηεγίζεθε από ηελ παξνπξία ή κε ηωλ γηπθζηηηκέλωλ θηαβνλόωλ. Σπνιύ ήκα απνπεί έζκαηα ηο παξνύζαο δπαηξίβήο ζπκβαίνοπ ζηελ αλάπηημε κεζόδωλ γηα ηηλ ελνηηκό ηαλλίωξώλ θπηώλ, κε αλζει κηζηέο ηήηεηαο.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ACP</b>	Analyse en composantes principales
<b>ADD</b>	Dérives d'amino-acetonitrile
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AH</b>	Anthelminthique
<b>BZs</b>	Benzimidazoles
<b>C</b>	Catéchol (catechin)
<b>Da(s)</b>	Daltons
<b>DL</b>	Dose létale
<b>DI</b>	Dose inhibitrice
<b>DP</b>	Plante sèche
<b>EC</b>	Epicatéchol (epicatechin)
<b>EGC</b>	Epigallocatechol (epigallocatechin)
<b>g</b>	Gramme
<b>GABA</b>	Acide gamma aminobutyrique
<b>GC</b>	Gallocatechol (galocatechin)
<b>GI(s)</b>	Gastro-intestinal(aux)
<b>GIN(s)</b>	Nématodes gastrointestinaux
<b>HCl</b>	Acide hydrochlorhydrique
<b>HPLC</b>	Chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>Kg</b>	Kilogramme
<b>L1s</b>	Larves de stade 1
<b>L2s</b>	Larves de stade 2
<b>L3s</b>	Larves de stade 3
<b>L4s</b>	Larves de stade 4
<b>LEIA</b>	Méthode d'inhibition du dégainement larvaire
<b>LMIA</b>	Méthode d'inhibition de la migration larvaire
<b>MCA</b>	Analyse en correspondances multiples
<b>mDP</b>	Degré moyen de polymérisation
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>OH</b>	Hydroxyle
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>OPG</b>	Oeufs par gramme
<b>PC</b>	Procyanidol (procyanidin)
<b>PD</b>	Prodelphinidol (prodelphinidin)
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PM</b>	Poids moléculaire
<b>PSMs</b>	Métabolites secondaires des plantes
<b>PRPs</b>	Protéines riches en proline
<b>PVPP</b>	Polyvinyl polypyrrolidone
<b>SGIs</b>	Strongles gastro-intestinal(aux)
<b>TCs</b>	Tannins condensés
<b>THs</b>	Tannins hydrolysables
<b>TR</b>	Riche en tanin
<b>TTs</b>	Tannins totaux

# **INTRODUCTION**

## 1. Les nématodes gastro-intestinaux des ruminants

### 1.1 Généralités sur les nématodes gastro-intestinaux

En médecine vétérinaire, les nématodes parasites du tube digestif des ruminants, domestiques communément appelés strongles gastro-intestinaux (GIs) ou digestifs, constituent une pathologie majeure au pâturage. Ces Nématodes appartiennent à deux superfamilles distinctes appartenant à l'ordre des Strongyloidea: les Trichostrongyloidea (principaux genres : *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* et *Nematodirus*) et les Strongyloidea (genre : *Oesophagostomum*) (Euzéby, 1963; Urquhart et al, 1996) (Tableau 1).

**Tableau 1. Principales espèces de trichostrongles des ruminants et leur localisation dans le tube digestif**

Sous-familles	Espèces	Localisation chez l'hôte	Hôtes
Haemonchinae	<i>Haemonchus contortus</i>	Abomasum	Ovins, Caprins
	<i>Haemonchus placei</i>		Bovins
	<i>Haemonchus longistipes</i>		Dromadaires
Trichostrongylinae	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Intestine grêle	Ovins, Caprins, Bovins
	<i>Trichostrongylus axei</i>	Abomasum	Ovins, Caprins, Bovins, Porcs, Cheveaux
	<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	Intestine grêle	Ovins, Caprins
	<i>Trichostrongylus capricola</i>	Intestine grêle	Ovins, Caprins
Ostertagiinae	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Abomasum	Ovins, Caprins
	<i>Ostertagia ostertagi</i>		Bovins
	<i>Ostertagia occidentalis</i>		Ovins
	<i>Ostertagia trifurcata</i>		Ovins, Caprins
Cooperiinae	<i>Cooperia curticei</i>	Intestine grêle	Ovins, Caprins
	<i>Cooperia oncophora</i>		Bovins
	<i>Cooperia punctata</i>		Bovins
Nematodirinae	<i>Nematodirus battus</i>	Intestine grêle	Ovins, Bovins
	<i>Nematodirus helvetianus</i>		Bovins
	<i>Nematodirus spathiger</i>		Ovins, Caprins, Bovins
	<i>Nematodirus fillicolis</i>		Ovins, Caprins
Oesophagostominae	<i>Oesophagostomum venulosum</i>	Caecum, Colon	Ovins, Caprins
	<i>Oesophagostomum columbianum</i>		Ovins, Caprins
	<i>Oesophagostomum radiatum</i>		Bovins, Buffalo
Chabertiinae	<i>Chabertia ovina</i>	Colon	Ovins, Caprins, Bovins

Les strongyloses GIs sont souvent dues à plusieurs espèces de nématodes présentes dans les divers organes du tube digestif.

Les nématodes GIs ont une distribution mondiale avec des prédominances d'espèces variables selon les grandes zones climatiques.

En zones tempérées, les genres de trichostrongles les plus fréquents dans les élevages de petits ruminants sont *Teladorsagia* spp : *T.circumcincta*, *T.trifurcata* (espèces abomasales), *Trichostrongylus* spp : *T.colubriformis*, *T.axei*, *T.vitrinus*, *T.capricola* (espèces abomasale ou intestinale) et *Cooperia* spp : *C.curticei*, *C.oncophora*, *C.punctata* (espèces intestinales) (Chartier



et Reche, 1992; Gasnier et al, 1997; Etter et al, 2000; O'connor et al, 2006). *Haemonchus contortus*, une autre espèce très pathogène de l'abomasum, est moins fréquent en zones tempérées bien qu'une enquête ait révélée, en élevages caprins, sa présence dans environ 40% des fermes en France (Chartier et Reche, 1992).

A l'inverse, en zones tropicales ou sub-tropicales, *H.contortus* est très largement repandu (Urquhart et al, 1996; Chartier et al, 2000c; O'connor et al, 2006). *T.colubriformis* et *O.columbianum* sont également trouvés régulièrement dans les principales régions chaudes et humides (Chartier et al, 2000c).

## 1.2. Cycle biologique

Le cycle biologique des nématodes GIs des ruminants est monoxène (à un seul hôte définitif). Il comprend deux phases : une phase libre dans le milieu extérieur (= phase exogène) et une phase parasitaire chez l'hôte (= phase endogène) (Urquhart et al, 1996; Chartier et al, 2000c).

### 1.2.1. La phase libre

Cette phase exogène du cycle débute par l'élimination dans les fèces d'œufs pondus par les vers femelles. Ces éléments assurent la contamination du milieu extérieur (prairies). Lorsque les conditions externes sont favorables (température minimale de 10°C ; humidité de 60%), les œufs s'embryonnent et éclosent, libérant des larves de stade 1 (L1s) (Euzéby, 1963; Smith et Sherman, 1994; Urquhart et al, 1996). Après deux mues successives, les L1s évoluent pour donner des larves 3 infestantes (L3s).

Contrairement aux œufs et L3s, les stades L1 et L2 sont peu résistants dans le milieu extérieur. En zones tempérées et selon les conditions environnementales, les L3s peuvent survivre plusieurs mois sur la prairie (O'Connor et al, 2006). Au contraire, en zones tropicales/sub-tropicales, la survie des L3s est seulement de quelques semaines en raison de leur activité qui épuise les réserves lipidiques (Urquhart et al, 1996; O'connor et al, 2006).

### 1.2.2. La phase parasitaire

Elle commence après l'ingestion des larves infestantes par l'hôte. La première étape de l'invasion du tube digestif par les L3s correspond à leur dégainement de l'exuvie des L2s, ce qui marque la transition entre vie libre et vie parasitaire (Sommerville et Rogers, 1987; Hertzberg et al, 2002). Après leur dégainement, les L3s pénètrent dans la muqueuse des organes digestifs où

elles muent en larves 4 (L4s). Celles-ci muent ensuite pour donner le stade 5, également appelé stade pré-adulte ou adulte juvénile. Le passage de S5 au stade adulte correspond à l'acquisition de la maturité sexuelle. Après fécondation par les mâles, les femelles pondent des œufs excrétés dans les matières fécales de l'hôte (Euzéby, 1963).

La chronologie du développement des stades parasites des nématodes GIs diffère en fonction de l'espèce, de l'importance de l'infestation ou de l'hôte (résistance). Le temps entre l'ingestion des L3s par l'hôte et la première ponte d'œuf par les vers adultes est appelé période prépatente. En général, la période prépatente dure de 2 à 3 semaines pour la plupart des espèces parasites chez les ovins et les caprins. Elle dure jusqu'à 5 semaines pour certaines espèces de *Strongyloidea* chez les bovins, notamment *Oesophagostomum radiatum* (Urquhart et al, 1996).

En périodes hivernales, en zones tempérées ou durant une longue période sèche en zones tropicales, il advient fréquemment que les larves s'enkystent dans la muqueuse digestive et entrent en hypobiose larvaire ce qui retarde alors leur développement. Ces larves reprennent ensuite leur évolution au printemps ou à la saison des pluies suivantes (Euzéby, 1963; Smith et Sherman, 1994; Chartier et al, 2000c). Dans ce cas, la durée de la période prépatente passe de 3 semaines à 3 ou 4 mois.

### 1.3. Biologie des larves infestantes

Sur le pâturage, les L3s des nématodes GIs possèdent une gaine (exuvie), vestige de la cuticule de la L2. Par la présence de cette gaine, les L3s sont très résistantes aux conditions extérieures (O'Connor et al, 2006). La durée de survie des L3s dépend de l'espèce, des conditions climatiques et de leur environnement (O'Connor et al, 2006). En général, les L3s d'*H.contortus*, survivent de 10 à 15 semaines au printemps mais seulement de 3 à 4 semaines lors d'un été chaud et sec. Les mousses et les matières fécales offrent des conditions optimales de survie pour les L3s en créant des micro-climats favorables (Rogers et Sommerville, 1963; O'connor et al, 2006).

En dehors des facteurs physiques, le stade L3 est également très résistant aux agents chimiques ou biologiques. Néanmoins, ces larves sont des proies ou des substrats naturels pour d'autres organismes notamment des bactéries (*Bacillus thuringiensis*) ou certains champignons qualifiés de nématophages (Larsen, 2000; Fontenot et al, 2003; Chandrawathani et al, 2004).

Les L3s sont très mobiles, et se déplacent horizontalement et verticalement sur l'herbe suivant un hygrotropisme positif (recherche d'humidité), un phototropisme négatif (fuite d'une trop forte lumière) ou un géotropisme négatif (élévation au dessus du sol) (Euzéby, 1963; Rogers et Sommerville, 1963). Cette mobilité favorise leur ingestion et augmente ainsi leur chance de parasiter les ruminants. Cependant, ces mouvements sont préjudiciables à leur survie car les L3s,

incapables de se nourrir, épuisent leurs réserves énergétiques par ces mouvements (Rogers et Sommerville, 1963; O'connor et al, 2006).

L'infestation de l'hôte par les L3s débute par le dégainement, c'est-à-dire la perte active de la gaine (=exuvie de la L2). Ce phénomène s'opère dans l'organe digestif qui précède immédiatement celui où s'établissent les vers adultes (Hertzberg et al, 2002). Ainsi, les L3s des espèces abomasales se dégainent dans le rumen alors que les espèces intestinales se dégainent dans l'abomasum (Rogers et Sommerville, 1963; Rahman et Collins, 1990a). Le dégainement est un processus restreint dans le temps (Dakkak et al, 1981; Hertzberg et al, 2002; De Rosa et al, 2005). Des études ont ainsi montré que la majorité des L3s d' *H.contortus* sont dégainées dès 60-80 minutes après ingestion par l'hôte (Dakkak et al, 1981; Hertzberg et al, 2002).

Le dégainement est un phénomène actif qui répond à divers stimuli tels l'exposition à la pression de CO<sub>2</sub>, la valeur de pH ou la variation de température suivant l'ingestion (Rogers et Sommerville, 1963 et 1968). Ces stimuli induisent la sécrétion par des cellules de glandes particulières de l'oesophage de la L3 ou l'excrétion par des pores excréteurs, d'un fluide riche en protéases et acétylcholinestérases (Rogers, 1982; Mallet et Lesage, 1987). Le dégainement comporte ensuite 3 étapes successives : 1) la formation d'un anneau indenté en zone antérieure de la gaine, 2) la digestion puis la séparation de cette coiffe antérieure du reste de la gaine, 3) la sortie de la L3 (Rogers et Sommerville, 1963; Gamble et al, 1989).

#### **1.4. Conséquences des strongyloses gastro-intestinales chez les ruminants**

Les conséquences des infestations par les strongles GIs diffèrent selon le niveau d'infestation de l'hôte. En général, les strongyloses digestives évoluent sous forme chronique, d'expression subclinique et provoquent des déficits de productions de portée économique sévère. Toutefois, en cas d'infestations massives, ce parasitisme par des nématodes GI peut entraîner aussi des signes cliniques, voire parfois la mort des animaux les plus sensibles.

Le degré de ces conséquences dépend, à la fois de facteurs liés à l'hôte (ex : espèce, âge, état physiologique ou nutritionnel) ou aux nématodes (ex : nombre de vers, nature ou nombre d'espèces présentes le long des divers organes digestifs). Le niveau d'infestation (charge parasitaire globale) reste le facteur le plus important.

##### **1.4.1 Impact sur les productions**

En termes économiques, les strongyloses GIs sont reconnues, à l'échelle mondiale, comme une des premières pathologies des ruminants, en raison des pertes de production majeures qu'elles entraînent. En élevage, la présence des vers perturbe à la fois la quantité et la qualité des productions.

Le parasitisme par des nématodes GI est responsable de retard de croissance chez les agneaux (Kyriazakis et al, 1996) ou les chevreaux (Torres-Acosta, 1999) qui se traduisent par des réductions de poids de carcasse à l'abattage, combinées à des baisses de qualité des carcasses ou de la viande (Sykes et Coop, 1976 et 1977).

Chez les femelles laitières, les infestations par les trichostrongles GIs ont été régulièrement associées à des baisses de production de lait (Hoste et Chartier, 1993; Chartier et Hoste, 1994; Veneziano et al, 2007) et, parfois, à des altérations de composition (Chartier et Hoste, 1994), surtout observées sur les meilleures productrices d'un troupeau.

Enfin, de multiples études dans l'hémisphère sud ont montré que le parasitisme digestif des moutons était associé à des baisses de production et à des altérations de qualité de la laine (Knox et al, 2006).

#### **1.4.2 Tableau clinique des strongyloses gastro-intestinales**

L'évolution généralement chronique des strongyloses digestives conduit à une détérioration de l'état général des animaux qui peu à peu peut conduire à la mort. Auparavant, des symptômes généraux apparaissent tels une baisse d'appétit, un amaigrissement progressif, une asthénie ou des signes de malnutrition (Urquhart et al, 1996). Les signes de gastro-entérites accompagnées de diarrhées aiguës sont également très fréquents (Rahman et Collins, 1990b). Des symptômes plus spécifiques peuvent aussi être constatés selon l'espèce de nématodes en cause (Urquhart et al, 1996; Brugère-Picoux, 2004). Ainsi, lors d'infestation par l'espèce hématophage, *H.contortus*, des signes d'anémie et des œdèmes sous-mandibulaires sont souvent observés (Smith et Sherman, 1994; Urquhart et al, 1996). Il a été estimé qu'un mouton parasité par 5000 *H.contortus* perdait l'équivalent de 250 ml de sang par jour (Urquhart et al, 1996).

### **1.5 Mécanismes physiopathologiques et pathogéniques**

Les retards zootechniques ou les symptômes observés chez les animaux parasités par les nématodes GIs s'expliquent par une association de plusieurs perturbations de la physiologie digestive. Si les principaux processus physiopathologiques impliqués ont été largement étudiés les mécanismes pathogéniques à l'origine de ces perturbations restent souvent mal décrits.

#### **1.5.1. Effets sur la physiologie digestive**

##### **1.5.1.a. Diminution de l'ingestion**

En général, les infestations par les strongles GIs sont associées à une baisse d'appétit. Lors d'infestations massives, cette baisse d'appétit peut aller jusqu'à une anorexie quasi totale

(Urquhart et al, 1996; Hoste et al, 1997; Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Knox et al, 2006). Toutefois, les mécanismes pathogéniques en cause restent mal identifiés, même si le rôle possible d'hormones peptidiques, secrétées par des cellules digestives (ex : gastrine, cholecystokinine) a parfois été évoqué mais rarement confirmé (Symons et Hennesy, 1981; Fox et al, 1989; Dynes et al, 1990; 1998)

#### **1.5.1.b. Maldigestion et malabsorption**

Les nématodes qui parasitent les divers organes digestifs induisent des lésions majeures des épithéliums. Dans l'abomasum, la présence des vers est associée à des modifications des glandes gastriques, notamment à une moindre densité de cellules différenciées, en particulier les cellules à HCl. Dans l'intestin, à l'échelle tissulaire ou cellulaire, une abrasion des villosités, une hyperplasie des glandes de Lieberkuhn et une altération sévère (moindre différenciation) des entérocytes sont les principales lésions décrites (Hoste et al, 1997).

Logiquement, ces modifications structurales ont des répercussions fonctionnelles, notamment sur la digestion des aliments et l'absorption des nutriments le long du tractus digestif. Dans l'estomac fonctionnel des ruminants (l'abomasum), le parasitisme GI provoque une augmentation du pH gastrique entraînant une baisse d'activité de la pepsine ainsi qu'une profonde déplétion des activités enzymatiques intestinales associées aux entérocytes. La présence des vers est aussi à l'origine d'altérations de perméabilité des épithéliums et de perturbations du péristaltisme qui réduisent le temps de contact entre le chyme et les muqueuses (Hoste et al, 1997).

La combinaison de ces divers processus qui affectent soit les structures, soit les fonctions digestives explique les phénomènes de maldigestion /malabsorption classiquement décrits lors de strongyloses GIs (Hoste et al, 1997; Coop et Kyriazakis, 2001; Hoste, 2001b; Knox et al, 2006).

#### **1.5.1.c. Modification et réorientation des métabolismes**

Par ailleurs, les effets néfastes du parasitisme GI sur l'ingestion et la digestion des aliments sont accrus par une réorientation des métabolismes chez l'hôte (Hoste et al, 1997; Hoste, 2001b).

En bilan, les réductions d'ingestion et d'absorption résultent en une diminution des apports nutritionnels. En parallèle, la présence des vers augmente les besoins nutritionnels de l'hôte pour maintenir l'homéostasie sanguine (en cas de vers hématophages) et l'intégrité des épithéliums des muqueuses digestives et développer une réponse immunitaire (Fox, 1997; Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Coop et Kyriazakis, 2001; Kyriazakis et Houdijk, 2006). La conjonction de ces phénomènes conduit à une réquisition des nutriments, en particulier de protéines, pour réparer les lésions provoquées au niveau des sites parasités au détriment des sites habituels de synthèse de l'hôte (mamelle, follicule pileux, muscle), ce qui accroît les pertes de production. Ces profondes

perturbations des métabolismes protéique et énergétique issues du parasitisme par les nématodes GIs contribuent à accroître les déficits zootechniques (Fox, 1997; Hoste et al, 1997; Hoste et al, 2005b). Par ailleurs, Knox et al, (2006) ont suggéré que les métabolismes du phosphore, du calcium et du fer sont également modifiés par la présence des vers.

### **1.5.2. Les mécanismes pathogéniques**

Les perturbations pathophysiologiques sont la résultante d'effets purement mécaniques associés à des effets dus aux produits d'excrétion-sécrétion des nématodes.

#### **1.5.2.a. Les effets mécaniques**

Les lésions des muqueuses digestives sont dues en partie à un effet mécanique des vers liés à leur fixation aux épithéliums, les vers pouvant endommager les tissus digestifs de l'hôte par leurs structures anatomiques spécialisées (Hoste et al, 1997). Certaines espèces des *Strongylidae* (*Chabertia ovina* par exemple) présentent une capsule buccale développée qui leur permettent de se fixer aux épithéliums digestifs (Euzéby, 1963; Urquhart et al, 1996). Cependant, chez les *Trichostrongyloidea*, la capsule buccale est réduite. Seule l'espèce hématophage *H. contortus* présente une néoformation dentale. Toutefois, pour les espèces intestinales, telles *Trichostrongylus* ou *Cooperia spp*, un effet abrasif de la cuticule du vers sur les entérocytes a été évoqué (Durette-Desset, 1985; Hoste et al, 1997).

#### **1.5.2.b. Effets des produits d'excrétion-sécrétion**

La majorité des nématodes GIs libèrent dans leur environnement des produits d'excrétion-sécrétion (E/S). Leur nature biochimique est variée, incluant des protéines dont certaines sont dotées de propriétés enzymatiques (protéase, acétylcholinestérase) (Rogers, 1982; Mallet et Lesage, 1987; Hoste et al, 1997; Tort et al, 1999; Yan et al, 2010), mais aussi des glycoprotéines, des oses, des lipides, des prostanoïdes (Yatsuda et al, 2003; Garretson, 2007). Le rôle de ces produits d'E/S reste mal connu, mais leur intervention dans l'installation des L3s, le développement, la nutrition et la reproduction des vers chez l'hôte est largement suspecté (Huby et al, 1999a, b; Hoste et al, 1995). Certaines des molécules libérées auraient aussi un effet sur les muqueuses et les cellules de l'hôte, participant à la genèse des perturbations pathophysiologiques (Hoste et al, 1997) mais aussi contribuant à l'équilibre hôte-nématode parasite (Huby et al, 1999a; Hoste et al, 2001).

## 2 . Les anthelminthiques de synthèse et leurs limites

Depuis les premières molécules anthelminthiques (AHs) de synthèse apparues à la fin des années 1950 (la phénothiazine) (Waller 2006), la maîtrise des strongyloses GIs des ruminants a reposé traditionnellement sur l'emploi répété de ces anthelminthiques (AHs) administrés soit dans un but curatif (traitement tactique) ou préventif (traitement stratégique). L'AH idéal peut être défini comme un traitement multivalent, non-toxique et rapidement éliminé par l'hôte, facile d'administration et d'un coût raisonnable. Pendant de nombreuses années, les AHs de synthèse se sont avérés efficaces. Cependant, l'utilisation de ces molécules est confrontée désormais à diverses limites.

### 2.1. Classification des anthelminthiques de synthèse

Les AHs sont regroupés en différentes familles selon leur mode d'action. En médecine vétérinaire, trois grandes familles dites « à large spectre » sont utilisées chez les ruminants: a) les benzimidazoles et pro-benzimidazoles, b) les imidazothiazoles et les tétrahydropyrimidines, et c) les lactones macrocycliques (Tableau 2). Très récemment, une nouvelle molécule a été développée (le monepantel) qui représente le précurseur d'une quatrième famille, actuellement en voie de commercialisation.

Les benzimidazoles et pro-benzimidazoles sont efficaces contre les strongles GIs et respiratoires. De plus, certaines molécules de cette famille présentent aussi une activité contre les ténias et les douves. Les molécules de la famille des imidazothiazoles et tétrahydropyrimidines sont actifs uniquement contre les strongles GIs et pulmonaires. Les lactones macrocycliques, sont encore désignées comme des endectocides car ces molécules sont actives à la fois contre les nématodes GIs (endoparasites) et certains ectoparasites (acariens ou insectes) (Urquhart et al, 1996 ; Bengone-Ndong et Alvinerie, 2004).

Enfin, certaines molécules AHs présentent un spectre plus étroit vis-à-vis des strongles, tel le closantel ou le radoxanide dont l'activité vise en priorité les espèces hématophages comme *H.contortus*. Toutefois, ces molécules montrent aussi une efficacité sur des douves, voire des myases (oestrose).

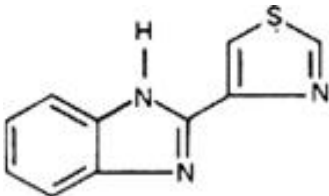
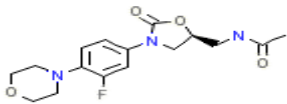
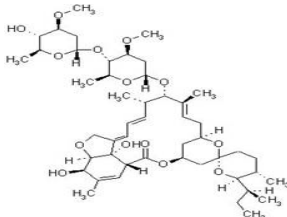
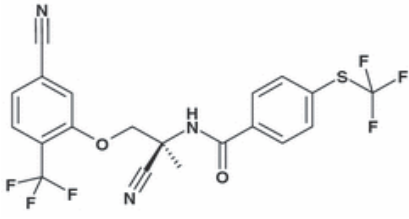
#### 2.1.1. Les benzimidazoles et les pro-benzimidazoles

Cette famille comprend de nombreux représentants partageant une structure chimique commune (Tableau 2). Le premier représentant le thiabendazole a été développé au cours des années 1960 (Cuckler et al, 1961). Ces molécules sont administrées par voie orale et sont commercialisées sous de forme de solution, de bolus ou associés à des blocs de compléments minéralo-vitaminiques (Smith et Sherman, 1994).



Les molécules de benzimidazoles agissent sous leur forme native directement sur les vers. A l'inverse, les pro-benzimidazoles sont en fait des prodrogues converties en molécules actives par des réactions enzymatiques, qui se déroulent en général dans le foie (Lanusse et Prichard, 1993). Le Nétohimin, par exemple, est un médicament prodrogue de sulfure de benzimidazole qui est converti en albendazole par la microflore gastro-intestinale après administration par voie orale ou intra ruminale chez des ovins et des bovins (Delatour et al, 1986; Lanusse et Prichard, 1990). Presque tous les albendazoles absorbés par l'intestin des ruminants sont rapidement métabolisés par des enzymes du foie en métabolites actifs contre les parasites, le sulfoxyde d'albendazole ou en métabolites sulfone inactifs (Delatour et al, 1986). Le mode d'action des benzimidazoles et des pro-benzimidazoles a été clairement identifié. Ces molécules se fixent spécifiquement à la  $\beta$ -tubuline des vers (Samsom-Himmelsjerna, 2007a) et empêchent ainsi la synthèse et la polymérisation des microtubules dans les cellules tégumentaires et intestinales des nématodes, sans altérer les tubulines de l'hôte. Ils perturbent ainsi des fonctions essentielles chez les vers telles le maintien de la morphologie cellulaire, ou la mitose, ce qui explique la létalité.

**Tableau 2. Principales molécules actives contre les strongles des petits ruminants**

Familles	Representants	Structure chimique de base	Spectre d'activité	Cibles suspectées
Benzimidazoles et Pro-Benzimidazoles	Oxfendazole Febantel Fenbendazole Thiabendazole Mebendazole Netobimin		SGI/SR SGI/SR SGI/SR SGI SGI SGI/SR/douve	$\beta$ -Tubuline
Imidazothiazoles et Tetrahydropyrimidines	Levamisol Pyrantel Morantel		SGI/SR	Recepteurs a l'acetylcholine
Lactones macrocycliques	Doramectine Epinomectine Ivermectine Moxidectine		SGI/SR Insectes Acariens	Canaux ioniques
Amino-acétonitrile dérivés (AADs)	Monepantel		SGI/SR	Agoniste nicotinique



### 2.1.2. Imidazothiazoles et Tétrahydropyrimidines

Les imidazothiazoles (lévamisole) et les tétrahydropyrimidines (pyrantel, morantel) présentent des structures chimiques différentes. Cependant, ils partagent le même mode d'action, ce qui explique qu'ils soient regroupés en une même famille (Tableau 2). Ces deux types d'AHs sont des cholinomimétiques qui affectent les récepteurs nicotiques à acétylcholine des nématodes GIs (Samsom-Himmelsjerna, 2007a). Leur fixation sur ces récepteurs provoque un changement de perméabilité membranaire post-synaptique conduisant à une contraction musculaire, une paralysie spastique et finalement, à l'expulsion et à la mort des vers.

### 2.1.3. Les lactones macrocycliques

Cette famille regroupe les avermectines (ivermectine, doramectine, eprinomectine) et les mylbémécines (moxidectine) qui présentent toutes deux des structures chimiques complexes avec de nombreux hétérocycles lactones (Tableau 2). Leur mode d'action qui reste mal identifié, paraît commun, unique et spécifique (Beugnet et al, 1997; Bengone-Ndong et Alvinerie, 2004). Certaines données indiquent que les lactones macrocycliques pourraient se fixer aux canaux ioniques glutamate-dépendant de la membrane des cellules neuromusculaires des nématodes et des arthropodes (Samsom-Himmelsjerna, 2007a), ce qui provoquerait l'ouverture de ces canaux et une augmentation de la perméabilité aux ions chlorures et entraînerait une inhibition du contrôle nerveux des muscles du pharynx, de l'utérus et des muscles du corps du vers, conduisant à la mort par paralysie (Urquhart et al, 1996; Beugnet et al, 1997; Bengone-Ndong et Alvinerie, 2004). Un effet antagoniste de l'acide gamma amino butyrique (GABA) a aussi été évoqué (Martin et al, 2002)

### 2.1.4. Le Monepantel

Le monepantel est un anthelminthique appartenant à la classe des dérivés d'acétylcholinestérase (AAD). Depuis 1981, et l'avènement de la première lactone macrocyclique, les ADDs sont la famille de molécule la plus récemment introduite sur le marché (2008). Concernant le mode d'action du monepantel, des études suggèrent qu'il agirait comme un agoniste nicotinique, mais médiée par un récepteur nicotinique acétylcholinestérase unique, spécifique (Kaminsky et al, 2008). Le spectre d'activité du monepantel inclut les quatrièmes stades larvaires et les formes adultes d'un large spectre d'espèces de nématodes. Cette nouvelle molécule est surtout efficace contre les souches résistantes aux autres familles anthelminthiques. Ces résultats d'efficacité sont complétés par la bonne tolérance et une faible toxicité pour les mammifères. L'utilisation proposée chez les ruminants est celle d'une administration unique par voie orale (2,5 mg / kg et 5 mg / kg de poids vif, chez les ovins et les bovins, respectivement). (Kaminsky et al, 2008, 2009; Sager et al, 2009; Hosking et al, 2008, 2009).

## **2.2. Limites d'utilisation des anthelminthiques de synthèse**

L'utilisation des AHs de synthèse pour traiter ou prévenir les strongyloses GIs se heurte désormais à plusieurs limites, en particulier le développement à l'échelle mondiale de résistances aux AHs de synthèse chez les nématodes GIs qui est devenu un phénomène très préoccupant pour la maîtrise de ce parasitisme helminthique, notamment chez les ovins et caprins.

### **2.2.1. Restrictions d'emploi des anthelminthiques**

L'inquiétude justifiée des consommateurs quant à la présence éventuelle de résidus de médicaments vétérinaires dans les produits d'origine animale a conduit à établir des règles d'utilisation qui touchent aussi les AHs de synthèse et contribuent à limiter leur usage et le choix des familles de molécules dans certaines productions, en particulier chez les espèces à vocation laitières.

De manière générale, le nombre d'AHs utilisables durant la lactation est beaucoup plus limité que pendant la période de tarissement. Ces restrictions d'emploi sont justifiées car certains AHs ou leurs métabolites sont éliminés par le lait. Ces restrictions conduisent à des délais d'attente pour la consommation du lait (de l'ordre de quelques jours) voire une interdiction totale d'emploi de certaines molécules chez les femelles en lactation (Chartier et Hoste, 1997). En raison du nombre plus restreint de molécules développées pour les ovins et les caprins laitiers, le nombre de familles disponibles s'avère très réduit. Ainsi, seuls le fébantel, l'oxfendazole et le fenbendazole (trois molécules benzimidazoles) disposent d'AMM avec des délais d'attente nuls pendant la lactation chez les petits ruminants.

### **2.2.2. Ecotoxicité des anthelminthiques**

Les AHs de synthèse sont généralement métabolisés dans le tractus digestif de l'animal ou par le foie après absorption (Mc Kellar, 1997). La majorité de ces molécules ou de leurs métabolites sont ainsi évacuées dans les fèces, en quantité plus ou moins importante. Depuis la fin des années 1990, des études ont examiné les conséquences possibles de ces AHs ou de leurs métabolites sur les écosystèmes prairiaux et certains de leurs composants biotiques (Mc Kellar, 1997; Williams, 1997; Jensen et al, 2003; Erzen et al, 2005; Lumaret et al, 1986, 2002).

Aucune toxicité n'a été décrite, pour les métabolites fécaux des benzimidazoles et du lévamisole. Par contre, pour certaines formes galéniques de certaines lactones macrocycliques, une toxicité pour des coleoptères coprophages a d'abord été signalée par observations de terrain puis a été confirmée au laboratoire (Wardhaugh et Rodriguez-Menendez, 1988; Mc Kellar, 1997; Lumaret et Errouisi, 2002). Cette écotoxicité potentielle s'explique par le spectre d'action élargi

(incluant les insectes) des endectocides et par des modes d'administration (bolus d'ivermectine) qui entraînent une élimination prolongée des résidus dans les matières fécales.

### **2.2.3. Résistance des nématodes gastro-intestinaux aux anthelminthiques**

Une population de nématodes GIs résistante aux AHs est définie par l'OMS comme une population ayant génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d'AH normalement léthales pour des individus de cette même espèce (Prichard et al, 1980; Sangster et Gill, 1999). Le phénomène de résistance étant fondé sur un déterminisme génétique, le caractère se transmet donc de manière héréditaire (Coles, 2002; Wolstenholme et al, 2004).

#### **2.2.3.a. Facteurs favorisant l'apparition des résistances**

Le phénomène évolue au fur et à mesure des générations successives (Jackson, 1993; Waller, 2006). Les parasites devenus résistants par mutation génétique sont au début peu nombreux, puis leur développement et leur abondance sont favorisés par la pression de sélection, associée à l'emploi répété des anthelminthiques chimiques de la même famille.

L'apparition, le développement et la diffusion des résistances sont liés à la pression de sélection associée à l'emploi répété d'AHs de la même famille (Jackson et Coop, 2000; Wolstenholme et al, 2004). En effet, notamment lorsque le déterminisme est d'origine monogénique ou oligogénique comme pour les benzimidazoles, après traitement, les nématodes GIs porteurs d'allèles „résistants”, les homozygotes, survivent contrairement à leurs congénères, sensibles. En conséquence, la proportion de vers porteurs d'allèles „résistants” augmente dans la population. L'avantage reproductif conféré ainsi à ces vers résistants va ensuite contribuer à propager les allèles de résistance dans la population de nématodes de l'élevage en question.

Plusieurs facteurs, intrinsèques (dépendants des nématodes) ou extrinsèques (liés à des facteurs anthropiques d'application des traitements), ont été identifiés comme favorisant la propagation des allèles de résistance dans une population de trichostrongles.

#### **2.2.3.b. Facteurs intrinsèques**

Certains éléments de la biologie des nématodes, expliquant la dynamique des populations, favorisent la diffusion accélérée des résistances aux AHs. La prolificité des vers et la durée du cycle biologique, c'est-à-dire le temps séparant deux générations, sont des facteurs importants. Plus l'espèce est prolifique, plus la diffusion de la résistance va être amplifiée. De même, plus la durée du cycle est courte, plus la propagation du caractère résistant sera rapide (Sanger et Gill, 1999; Paolini, 2004; Wolstenholme et al, 2004). Ces phénomènes expliquent notamment l'importance des cas de résistance signalés chez *H. contortus*.

### 2.2.3.c. Facteurs extrinsèques

Plusieurs facteurs opérationnels, dépendant des décisions de l'éleveur, sont également impliqués dans le développement plus ou moins rapide des résistances aux AHs (Coles et Roush, 1992; Smith et Sherman, 1994; Coles, 2002; Silvestre et al, 2002; Wolstenholme et al, 2004) :

- L'introduction d'animaux parasités par une souche résistante dans un troupeau, sans qu'un traitement soit appliqué et sans que l'efficacité soit contrôlée.
- Le sous-dosage. Les conséquences en ont été bien décrites pour les BZs. L'exposition des nématodes à des doses non-létales conduit à une sélection élevée des individus résistants par l'élimination des vers les plus sensibles (les homozygotes „sensible/sensible’) tout en conservant les vers résistants, non seulement les homozygotes „résistant/résistant’ mais aussi les hétérozygotes (Barnes et al, 1995). En conséquence, la fréquence des allèles de résistance dans la population de parasites est encore accrue.
- Une fréquence élevée des traitements et l'usage réitéré de la même classe d'AHs.
- L'absence de refuge. La notion de refuge correspond au sein d'une population totale, à la proportion de nématodes restant sensibles aux AHs (Jackson, 1993; Coles, 2002). Il faut souligner que la population totale de nématodes englobe les vers de la phase parasitaire présents chez les hôtes définitifs ainsi que les larves (notamment les L3s) présentes sur le pâturage (phase externe, non parasitaire du cycle).

L'application du principe de refuge peut ainsi d'abord reposer en promouvant le respect d'une proportion importante de nématodes sensibles sur la prairie (parcelles contaminées par une souche sensible) à la suite des traitements, ce qui conduit à éviter l'application de traitements à la sortie de l'hiver, ou très tôt par rapport à la période prépatente des vers. Une seconde option consiste à laisser des animaux non-traités au sein d'un troupeau, il reste alors une source de vers sensibles aux AHs, non-soumises à la pression de sélection (Wolstenholme et al, 2004).

### 2.2.3.d. Distribution géographique mondiale

Les premiers cas de populations de nématodes GIs résistantes aux AHs ont été signalés dès les années 1960s en Australie, Nouvelle Zélande et Afrique du Sud. Cependant, aujourd'hui, le phénomène est reconnu à l'échelle mondiale (Kaplan, 2004; Wolstenholme et al, 2004; Pomroy, 2006; Waller, 2006; Besier, 2007).

### 2.2.3.e. Espèces animales en cause

Les cas de résistance aux AHs ont été d'abord et majoritairement décrits chez les petits ruminants. En particulier, la prévalence des phénomènes de résistances paraît plus importante

chez les chèvres que chez les moutons (Chandrawathani et al, 1999; Jackson et Coop, 2000; Chartier et al, 2001). Des cas chez les parasites de porcins ou d'équins ont ensuite été signalés (Gerwert et al, 2002; Prichard, 1994; Kaplan, 2002). Les parasites de bovins sont apparus pendant longtemps indemnes des cas de résistance. Cependant, ils sont désormais de plus en plus fréquemment mentionnés (Waller, 1997; Coles, 2002; Kaplan, 2004; Wolstenholme et al, 2004).

#### **2.2.3.f. Espèces parasites concernées**

En raison de la prolificité de l'espèce et de sa forte prévalence dans l'hémisphère sud, les premiers cas de résistances aux AHs ont été décrits chez *H.contortus*. Désormais, il a été fait mention des mêmes processus pour toutes les espèces de nématodes GIs des petits ruminants, notamment pour les genres *Trichostrongylus spp.* et *Teladorsagia spp.* (Jackson et Coop, 2000; Kaplan, 2004; Wolstenholme et al, 2004; Besier, 2007). Chez les bovins, les cas de résistance décrits concernent surtout les espèces intestinales du genre *Cooperia spp.* (Waller, 1997; Suarez et Cristel, 2007).

#### **2.2.3.g. Familles d'anthelminthiques concernées**

De manière générale, les premiers cas de résistance aux AHs apparaissent environ 10 ans après la commercialisation des molécules (Kaplan, 2004; Waller, 2006). Ainsi, les premiers cas de résistances décrites ont concerné les benzimidazoles. De même, les premiers cas de résistances aux ivermectines ont été décrits dès 1985 (Geary, 2005). Aujourd'hui, toutes les classes d'AHs de synthèse sont impliquées (Kaplan, 2004; Wolstenholme et al, 2004; Artho et al, 2007), à l'exception du monepantel, récemment commercialisé (Kaminsky et al, 2008, 2009).

Par ailleurs, des cas de résistances multiples (à diverses familles d'AHs) sont de plus en plus souvent mentionnés, ce qui en pratique conduit les éleveurs à une impasse thérapeutique. Signalées dès les années 1990s en Australie, en Afrique du Sud et en Nouvelle Zélande (Van Wyck et al, 1997; Pomroy et al, 1992; Urquhart et al, 1996; Kaplan, 2004; Besier, 2007), les résistances multivalentes ont été décrites plus récemment également en Asie du Sud-est (Chandrawathani et al, 1999) et en Europe (Jackson, 1993; Chartier et al, 2001; Yue et al, 2003; Bartley et al, 2003).

#### **2.2.3.h. Mécanismes des résistances aux anthelminthiques**

Trois phénomènes généraux peuvent expliquer le développement de résistances à tout xénobiotiques, ce qui inclut les AHs (Wolstenholme et al, 2004): **1)** la modification de la molécule cible, **2)** des changements des voies métaboliques qui induiraient l'inactivation ou

l'élimination accélérée des molécules AHs, **3**) l'amplification du nombre des cibles pour diluer l'activité des molécules AHs dans l'organisme du vers. La résistance initiale chez certains vers de la population serait préacquise, résultant d'une (ou de plusieurs) modification(s) génétique(s) issues de mutation.

Les mécanismes de résistance semblent être spécifiques du mode d'action correspondant à chaque famille de molécules AHs (Samsom-Himmelsjerna, 2007b). Celui de la résistance aux benzimidazoles a été le plus largement étudié. Il paraît lié à une mutation du gène codant pour la  $\beta$ -tubuline des nématodes, portant sur une modification provoquant un changement d'acide aminé de la tubuline (Sanger et Gill, 1999; Wolstenholme et al, 2004; Samsom-Himmelsjerna, 2007b). Pour le lévamisole, la résistance serait associée à une modification des récepteurs nicotiniques, qui répondent à l'acétylcholine (Sanger et Gill, 1999; Samsom-Himmelsjerna, 2007b). Pour les ivermectines et mylbemycines, les mécanismes de résistance sont moins bien identifiés. Il s'agirait d'un phénomène plus complexe qui reposerait sur des mécanismes de mutation des gènes impliqués dans la réponse cellulaire au GABA ou de surexpression de la glycoprotéine P impliquée dans la détoxification cellulaire (Gill et Lacey, 1998; Sanger et Gill, 1999; Wolstenholme et al, 2004; Samsom-Himmelsjerna, 2007b). Ce dernier mécanisme est aussi suggéré pour expliquer les cas de résistances multiples (Lespine et al, 2008; Kerboeuf et al, 2003)

### **3. Les méthodes alternatives aux anthelminthiques de synthèse**

En raison des limites croissantes rencontrées dans l'usage des AHs de synthèse, les recherches se sont accrues pour réactualiser ou développer des méthodes alternatives de lutte contre les strongyloses GIs. Ces méthodes s'appuient sur 3 principes généraux de prévention / traitement visant à : 1) réduire l'origine (les sources) des contaminations, 2) augmenter la résistance de l'hôte, ou 3) éliminer les nématodes GIs (Torres Acosta et Hoste, 2008).

#### **3.1. Réduire les sources de contamination des animaux.**

Le tarissement de la contamination vise à bloquer le cycle biologique des nématodes GIs en agissant soit sur l'importance des larves infestantes présentes dans le milieu extérieur (= réduction de l'infestivité du pâturage), ou afin de limiter au maximum les risques de contact entre L3s et hôtes sensibles (Hoste et al, 1997; Heckendorn, 2007). Ces objectifs peuvent être obtenus par trois moyens principaux (Barger, 1999; Pomroy, 2006):

- la prévention. Elle consiste à déplacer des animaux sains, sans parasites, sur des pâtures propres, peu contaminées,
- l'évasion. Elle repose sur le transfert d'animaux traités par des AHs de pâtures contaminées vers des pâtures propres.

Ces principes de prévention ou d'évasion supposent la disponibilité de prairies propres ou à faibles niveaux d'infestivité. Un moyen d'assainir les parcelles consiste à attendre la mort naturelle des L3s infestantes présentes sur l'herbe avant le retour des animaux sur cette même parcelle (Hoste et al, 2004; Pomroy, 2006; Legarto et Leclerc, 2007). Ce principe fondateur des méthodes agronomiques de rotation des pâtures offertes aux animaux s'est souvent avéré peu efficace en zones climatiques tempérées en raison de la durée longue de survie des larves (de 6 à 12 mois selon les espèces) (Hoste et al, 1999, 2003). A l'inverse, son intérêt a été plusieurs fois confirmé en régions tropicales où les larves, en particulier celles d'*Haemonchus*, montrent une durée de vie beaucoup plus réduite (2 mois) (Barger et al, 1997; Mahieu et al, 2008)

- la dilution qui vise à réduire le risque d'infestation par des L3s parasites en diminuant leur concentration sur le pâturage.

La dilution d'infestivité du pâturage peut d'abord être obtenue par diminution de la densité animale (Etter et al, 2000). Cependant, le mélange d'animaux sensibles et résistants au parasitisme selon des critères d'âges différents ou par pâturage mixte, alterné ou simultané, entre deux espèces d'hôtes ayant des spécificités différentes vis-à-vis des espèces de nématodes GIs a aussi été exploré (Niezen et al, 1996; Barger, 1999; Waller, 2004; Stromberg et Gasbarre, 2006; Rocha et al, 2008; Mahieu et al, 2008; Hoste et al, 2010).

Enfin, une réduction active de l'infestivité a été aussi obtenue en exploitant soit des moyens chimiques (ex : cyanamide calcique), mais surtout physiques (exploitation préférentielles des pâturages après fauches, retournement par labour, ou écobuage) (Hoste et al, 2004; Hounzangbe-Adote, 2004), ou enfin par des méthodes de lutte biologique. En ce domaine, la plupart des études ont porté essentiellement sur les propriétés nématophages de certains champignons microscopiques dont les myceliums parasitent les L3s de nématodes et favorisent ainsi une moindre contamination des prairies (Niezen et al, 1996; Thamsborg et al, 1999; Waller et Thamsborg, 2004; Ketzis et al, 2006; Legarto et Leclerc, 2007).

### **3.2. Améliorer la résistance de l'hôte**

A l'heure actuelle, trois voies sont explorées correspondant à cette stratégie: a) le développement de vaccins, b) la sélection d'animaux résistants aux nématodes GIs, c) l'amélioration de la nutrition de l'hôte.

#### **3.2.1. La vaccination**

Le principe de la vaccination consiste à mettre en contact préventivement l'hôte avec de faibles doses d'antigènes parasites de manière à stimuler ses défenses immunitaires et ainsi, le protéger contre des infestations futures par ces mêmes nématodes (Waller et Thamsborg,



2004; Jackson et Miller, 2006; Ketzis et al, 2006). Le concept visant à vacciner les ruminants contre les nématodes n'est pas récent puisque dès les années 1960, certaines études cherchaient à valider l'utilisation de L3s irradiées d'*H. contortus* et de *T. colubriformis* pour protéger les animaux (Mulligan et al, 1989). Des études beaucoup plus récentes ont pour leur part cibler des antigènes isolés de tissus spécifiques du tube digestif des nématodes GIs (notion d'antigènes cachés) (Newton, 1995; Knox et al, 2005; Smith et Zarlenga, 2006; Smith 2008).

### 3.2.2. La sélection d'animaux génétiquement résistants

La sélection d'animaux résistants aux nématodes GIs est une approche qui a été envisagée depuis longtemps dans l'hémisphère Sud pour réduire l'emploi d'AHs de synthèse (Albers et al, 1987; Windon, 1996; Baker et al, 1998; Pomroy, 2006), en se fondant sur la sélection des animaux les plus résistants. Ce concept a été développé soit entre races différentes, soit intra races. Une telle sélection appliquée sur plusieurs années doit conduire en théorie à une réduction des infestations chez l'hôte et à une diminution progressive de contamination des pâturages (Windon, 1996; Baker et al, 1998).

### 3.2.3. L'amélioration de la ration de l'hôte

La présence des strongles dans le tractus GI est associée à de nombreuses lésions et à de sévères perturbations de la physiologie digestive qui induisent des conséquences majeures sur le métabolisme de l'hôte notamment en ce qui concerne la fraction protéique et, à moindre degré, la composante énergétique (Fox, 1997; Coop et Kyriazakis, 2001; Hoste et al, 2005b; Knox et al, 2006).

En partant de ce constat, il a été suggéré, *a contrario*, qu'en améliorant la ration alimentaire pour couvrir les besoins supplémentaires associés à la présence des nématodes, il serait possible d'améliorer aussi la réponse de l'hôte au parasitisme, en particulier lorsque les ajustements portent sur des ressources limitantes dans la ration (Coop et Kyriazakis, 1999). Il est reconnu qu'en général, le métabolisme protéique est plus affecté par le parasitisme GI que le métabolisme énergétique (Bown et al, 1991; Coop et Kyriazakis, 1999). En conséquence, la plupart des études ont été consacrées aux bénéfices éventuels liés à une supplémentation protéique et ont souvent confirmé l'intérêt de l'approche (Coop et Kyriazakys, 2001; Hoste et al, 2005). Toutefois, dans certaines situations, telle l'abondance de légumineuses comme source nutritionnelle en zone tropicale, des complémentations énergétiques se sont avérées également efficaces (Torres Acosta et al, 2004).



### 3.3. Eliminer les nématodes gastro-intestinaux

Le principe visant à débarrasser l'hôte des vers reste un des meilleurs moyens pour casser le cycle biologique des parasites. Pour éviter le développement ou l'apparition des résistances aux AHs de synthèse, la possibilité d'exploiter des traitements alternatifs a été explorée depuis près de vingt ans. La maîtrise des strongyloses GIs pourrait ainsi reposer sur une combinaison de traitements „classiques’ par AHs de synthèse, utilisés de façon raisonnée, et de traitements “alternatifs”.

Ces méthodes alternatives reposent sur l'administration de substances à propriétés antiparasitaires qui étaient souvent la base de la pharmacopée vétérinaire avant le développement des AHs de synthèse. C'est le cas notamment de l'oxyde de cuivre qui, utilisé sous forme d'aiguilles à relargage lent, présente une activité significative sur *H.contortus* chez les ovins et les caprins (Burke et al, 2010).

L'exploitation de plantes à propriétés AHs représente l'autre grand volet des traitements innovants explorés.

#### 3.3.1. Les plantes à propriétés anthelminthiques

Sur la plupart des continents, notamment dans les pays en voie de développement, la médecine traditionnelle basée sur un savoir empirique d'utilisation des plantes (ethnomédecine vétérinaire) reste très répandue (Hounzangbe-Adote, 2004; Githiori et al, 2005; Githiori et al, 2006; Waller, 2006). Par ailleurs, l'intérêt croissant des pays développés pour une agriculture durable ou biologique, cherchant à réduire les intrants chimiques en élevage explique l'attention actuelle portée aux propriétés de composés naturels bioactifs associés aux plantes (Waller, 2006; Waller et Thamsborg, 2004).

Outre le fait de compléter l'action des AHs de synthèse et de réduire ainsi la pression de sélection pour les résistances aux AHs, l'exploitation de plantes bioactives présente plusieurs avantages en élevage : a) la disponibilité des ressources, b) l'absence actuelle de résistances aux composés actifs chez les vers et c) un faible coût par rapport aux AHs de synthèse, notamment dans les pays en développement.

Les plantes peuvent être exploitées soit sous la forme traditionnelle de remèdes de phytothérapie, fondés sur des préparations médicinales, soit selon le concept plus novateur de nutriment exploitant les plantes entières, souvent sous forme de fourrages.

Les préparations phytothérapeutiques à base de plantes sont souvent des mélanges complexes de composés actifs, donnés pour une période courte et visant à traiter les animaux infestés. Le nutriment est défini comme une plante consommée par les animaux dont l'intérêt tient d'avantage à sa propriété bénéfique pour la santé qu'à sa valeur nutritive *sensu stricto*

(Andlauer et Furst, 2002; Waller et al, 2001). Leur incorporation dans la ration, sur des périodes plus longues (quelques jours au moins) est généralement conçue avec un but préventif.

Les études sur l'effet AH de plantes ont permis de confirmer l'intérêt potentiel de remèdes à base d'ail, d'aloès, ou d'armoise, mais aussi d'identifier des candidats nutriments tels la chicorée, le sulla ou le sainfoin mais aussi la papaye, les feuilles de manioc ou certaines légumineuses arbustives en régions tropicales (Marley et al, 2003 et 2006; Paolini et al, 2004; Stepek et al, 2004; Hounzangbe-Adote et al, 2005; Githiori et al, 2006; Chagas et al, 2008; Sokerya, 2009).

L'utilisation potentielle de plantes bioactives présente aussi des limites. La première concerne le manque d'informations scientifiques sur leurs composés actifs, leur mode d'action et les facteurs influençant leur efficacité. Leur toxicité éventuelle chez l'animal et la posologie adéquate pour avoir un effet bénéfique sans nocivité sont aussi à définir avant toute exploitation (Waller et al, 2001; Waller, 2004; Githiori et al, 2005; Githiori et al, 2006; Hördegen et al, 2006). Cependant, en raison de leur exploitation usuelle comme fourrages, les nutriments sont souvent considérés comme étant à faible risque toxique. La variabilité inhérente aux plantes selon les conditions environnementales de croissance ou selon les espèces ou variétés exploitées doit aussi être prise en compte et comprise afin de standardiser au mieux les traitements phytothérapeutiques en fonction de la plante, de la situation géographique et climatique ainsi que des pratiques d'élevage (Rochfort et al, 2008). Une dernière limite tient à un risque écologique possible. Des cas de surexploitation de plantes en raison de leurs propriétés médicinales ont déjà été signalés avec une incidence écologique liée au risque de disparition d'espèces végétales ou d'écotypes d'intérêt dans certaines régions (Hounzangbe-Adote, 2004). La nature des molécules actives de ces plantes reste souvent mal identifiée, même si un rôle majeur des métabolites secondaires est généralement évoqué. Les molécules suspectées appartiennent à des classes biochimiques différentes, telles des protéinases (Stepek et al, 2004), des alcaloïdes (Githiori et al, 2006), des saponines (Deepak et al, 2002), ou des polyphénols ou des tannins condensés (Paolini et al, 2003b; Barrau et al, 2005) (Tableau 3). Pour ne prendre que quelques exemples, Chagas et al, (2008) ont montré, chez le mouton, que des alcaloïdes seraient responsables de l'effet anthelminthique d'*Azadirachta indica* (Neem). Des sesquiterpènes lactones sont soupçonnés d'être responsables des propriétés anthelminthiques de la chicorée (*Cichorium intybus*) (Marley et al, 2003, 2006). Githiori et al, (2006) ont mentionné que les composés responsables pour l'activité anthelminthique de *Calotropis procera* et de *Terminalia glaucescens* semblent être les alcaloïdes et des triterpènes et des anthraquinones, respectivement. Les saponines et glucosides ont été indiqués par Deepak et al, (2002) comme à l'origine des effets de *Tribulus terrestris*. Le rôle des tanins condensés chez certaines légumineuses fourragères sera décrit ultérieurement dans cette introduction.

Dans le domaine de la maîtrise des SGLs, les études se sont multipliées depuis 20 ans et ont montré que l'exploitation des propriétés AHs de plantes bioactives, représente une alternative valide à l'emploi des AHs de synthèse (Niezen et al, 1995; Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Githiori et al, 2006; Hoste et al, 2006; Ketzis et al, 2006). En particulier, les résultats concordants ont souligné l'intérêt potentiel de plantes, notamment de légumineuses, riches en tannins condensés.

## **4. Les tannins**

### **4.1. Généralités et définition**

Le terme de tannins qualifie toute substance d'origine végétale ou minérale ayant la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible, le cuir (Bruneton, 1999). Cette propriété est liée à la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau.

Une première définition biochimique pour les tannins végétaux a été proposée par Bate-Smith (1973) : « les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles de poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3 000 Da qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ». Cette définition a ensuite été complétée grâce aux méthodes d'analyse biochimique récentes qui ont conduit à identifier la structure des tannins. Ils sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000Da (Hagerman, 2002). Selon leur structure, ils sont généralement classés en deux groupes: les tannins hydrolysables (THs) et les tannins condensés (TCs) largement présents dans les diverses espèces botaniques, notamment chez les végétaux supérieurs (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999; Hagerman, 2002; Mueller-Harvey, 2006).

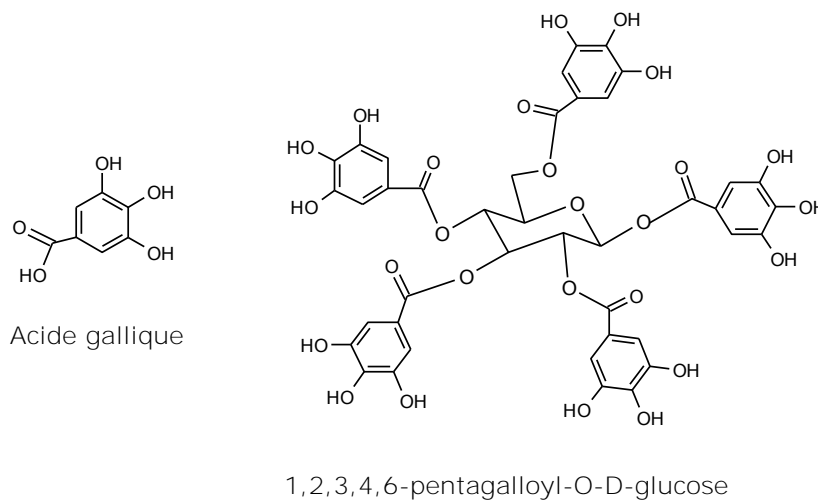
### **4.2. Classification biochimique des tannins**

La grande famille des polyphénols s'étend de molécules simples, comme les acides phénoliques, aux molécules hautement polymérisées, comme les tannins. Quelque soit leur groupe, TH ou TC, la structure biochimique des tannins comprend au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements phénoliques.

#### 4.2.1. Les tannins hydrolysables

Ce sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, et de molécules d'acide-phénol (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2006). Selon la nature de l'acide-phénol, ils sont sub-divisés en tannins galliques qui ont un acide gallique (Figure 1), ou en tannins éllagiques présentant un acide hexahydroxyphénique (Hagerman, 2002).

**Figure 1. Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique.**

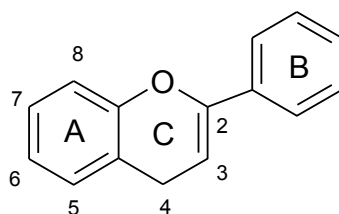


En général, les THs ont un faible PM, mais des couplages oxydatifs entre THs peuvent produire des polymères de PMs plus importants (Mueller-Harvey, 2001). Seules les molécules de triesters ou de PM supérieurs présentent les propriétés classiques des tannins (Bruneton, 1999).

Le terme « tannin hydrolysable » fait référence à leur susceptibilité à l'hydrolyse acide. Ils sont notamment hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants et leurs produits de dégradation peuvent être absorbés. Ils peuvent alors provoquer des intoxications graves, lors d'ingestion trop massive, en générant des lésions hépatiques et rénales (Zhu et al, 1992; Plumlee et al, 1998; Jean Blain, 1998).

#### 4.2.2. Les tannins condensés

Les tannins condensés (TCs), ou proanthocyanes, sont des polyphénols de la famille des flavonoïdes (Mueller-Harvey, 2006; Bruneton, 1999), dont la structure chimique repose sur un système d'hétérocycles (Figure 2)

**Figure 2. Structure chimique de base des flavonoïdes.**

De manière générale, les flavonoïdes sont souvent assimilés à des pigments, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles des végétaux, comme les flavonoïdes jaunes (chalcones, aurones, flavonols jaunes), les anthocyanosides rouges, bleus ou violets. La zone d'absorption de la lumière de la molécule est parfois située dans le proche ultraviolet, la « coloration » n'étant alors visible que par les insectes pollinisateurs. En plus certains flavonoïdes jouent aussi un rôle important dans la croissance, le développement et la reproduction des plantes, leur protection contre le rayonnement UV-B, et possèdent des propriétés de défense des plantes contre divers agresseurs ou pathogènes : insectes, champignons ou bactéries. Selon leur structure de base, les flavonoïdes sont généralement répartis en 6 sous-groupes auxquels il faut ajouter les neoflavonoids, aurons, catéchines. (Bruneton, 1999)

**Tableau 3 : Les diverses classes de flavonoïdes**

Flavonols	Flavones	Isoflavones	Flavonones	Flavanols	Anthocyanidins
Fisetin	Apigenin	Daidzin	Eriodictyol	Catechin (C)	Apigeninidin
Galangin	Baicalein	Genistein	Hesperidin	Gallocatechin (GC)	Cyanidin
Kaempferide	Chrysin	Irilone	Hesperetin	Epicatechin (EC)	Delphinidin
Kaempferol	Diosmetin	Luteone	Likvirin	Epigallocatechin(EGC)	Diosmetinidin
Morin	Diosmin	Prunetin	Naringin	EC-gallate	Fisetinidin
Myricetin	Flavonz	Pratensein	Naringenin	EPG-gallate	Luteolinidin
Quercetin	Luteolin		Picocembrin	Theaflavin	Malvidin
Rhamnetin	Rpoifolin			Theaflavin-gallate	Pelargonidin
Robinin	Tangeretin			Theaflavin-digallate	Peonidin
Rutin	Techtochrysin			Thearubigins	Robinetinidin

La distribution et le type de flavonoïdes retrouvés varient en fonction de la famille de plantes. La présence de flavonoïdes dans les algues n'a pas, à ce jour, été démontrée. S'ils sont fréquents dans les Bryophytes et les Ptéridophytes, ce sont toujours des flavonoïdes *stricto sensu*, majoritairement des O-et C-hétérosides de flavones et des dérivés O-uroniques. Les O-hétérosides de flavonols dominent chez les Fougères bien que certaines produisent aussi des chalcones ou des proanthocyanidols. Chez les Gymnospermes, les proanthocyanidols sont remarquablement constants et l'on note la présence, chez les Cycadales et les Coniférales, de biflavonoïdes absents chez les Gnétales, la distribution de ces composés et des hétérosides de

flavones et flavonols qui les accompagnent variant nettement en fonction de l'organe (bois, écorce, feuilles) (Bruneton, 1999).

Les TCs sont des polymères de flavan-3-ols (Figure 3) liés par des liaisons de type C-C (Type B) ou C-O-C (type A) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999; Feucht et Treutter, 1999; Schofield et al, 2001). En général, les TCs ont des PMs plus élevés que ceux des THs (Hagerman, 1992)

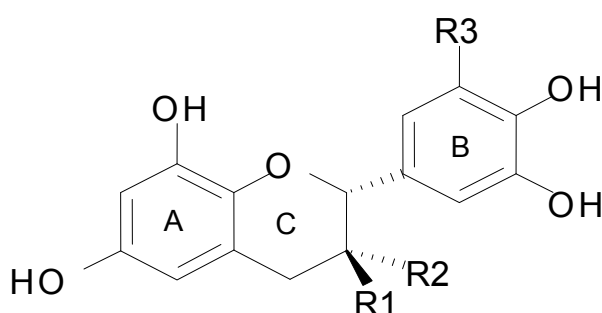
Dans la nomenclature française, les noms des divers TCs se terminent en «-ols» alors que dans la nomenclature anglaise, les terminaisons sont en «-ins». Les TCs sont définis selon

- la nature (et le nom) des monomères qui les constituent
- la position et la stœchiométrie ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) de la (ou des) liaison(s) interflavanique(s).
- le degré de polymérisation (nombre de flavan-3-ols impliqués dans le TC), Il est usuel de parler d'oligomères (= de 2 à 10 monomères) ou des polymères (plus de 10 monomères).
- par ailleurs, on distingue des homo-polymères qui présentent une seule classe de flavan-3-ols dans leur structure (Figure 3) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Hagerman, 2002) des hétéro-polymères qui comprennent des monomères de classes différentes (Mueller-Harvey 2006; Hedqvist et al, 2000).

#### 4.2.2.a. Structure biochimique des flavan-3-ols

La présence d'un hydrogène (H) ou d'un groupement phénol (OH) aux positions R1, R2 et R3 permet d'identifier les 4 classes de flavan-3-ols (Figure 3).

**Figure 3. Structure chimique des différents flavan-3-ols et classes d'homo-polymères correspondants.**



Flavan-3ols	Classes d'homo-polymères	R1	R2	R3	Nombre de fonctions OH
Catechol	Procyanidols	OH	H	H	5
Epicatechol	Procyanidols	H	OH	H	5
Gallocatechol	Prodelphinidols	OH	H	OH	6
Epigallocatechol	Prodelphinidols	H	OH	OH	6
Fisetinidinol	Profisetinidols	H	H	H	4
Robinetinidol	Prorobinetinidols	H	H	OH	5

En fait, les monomères des prodelphinidols (ou prodelphinidins) (PDs) se différencient de ceux des procyanidols (ou procyanidins) (PCs) par la présence d'un groupement OH en position R3, ce qui leur donnent une capacité accrue à se complexer aux protéines (Aerts et al, 1999; Schofield et al, 2001).

Parfois, le flavan-3-ol est estérifié par un acide gallique en position R2 (Figure 2) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992). La présence d'un ou plusieurs acides galliques modifie les propriétés biologiques des TCs (Schofield et al, 2001; Hagerman, 2002).

#### 4.2.2.b. Structure biochimique des polymères

Les végétaux supérieurs contiennent majoritairement deux classes d'homo-polymères : les PCs composés uniquement de catéchol (C) ou d'épicathécol (EC), et les PDs constitués uniquement de gallocatéchol (GC) ou d'épigallocalatéchol (EGC) (Figure 4) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999). Deux autres classes d'homo-polymères sont plus rarement rencontrées : les profisetidinols (profisetidinins) et les prorobinétidinols (prorobinetidinins) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Collingborn et al, 2000). Néanmoins, des hétéro-oligomères, composés à la fois de C ou EC et de GC ou EGC, ont également été identifiés chez certaines plantes (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992), c'est notamment le cas du sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) (Marais et al, 2000).

Les liaisons interflavaniques, majoritairement de type Carbone-Carbone (Type B) sont surtout établies entre le C8 du monomère terminal et le C6 du monomère ajouté. Dans ce cas, les TCs présentent une structure linéaire. Toutefois, des liaisons entre le C6 du monomère terminal et le C4 du monomère additionné ont aussi été décrites (Bruneton, 1999; Feucht et Treutter, 1999; Hagerman, 2002). Un second type de liaison (Type A) existe qui fait intervenir à la fois une liaison C4-C8 et une liaison C2-O-C7 entre deux monomères (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Mueller-Harvey, 2006). Il en résulte des structures branchées (liaisons C8-C6 ou C4-C6) (exemple les TCs du quebracho) (Hagerman, 2002) (Figure 4).

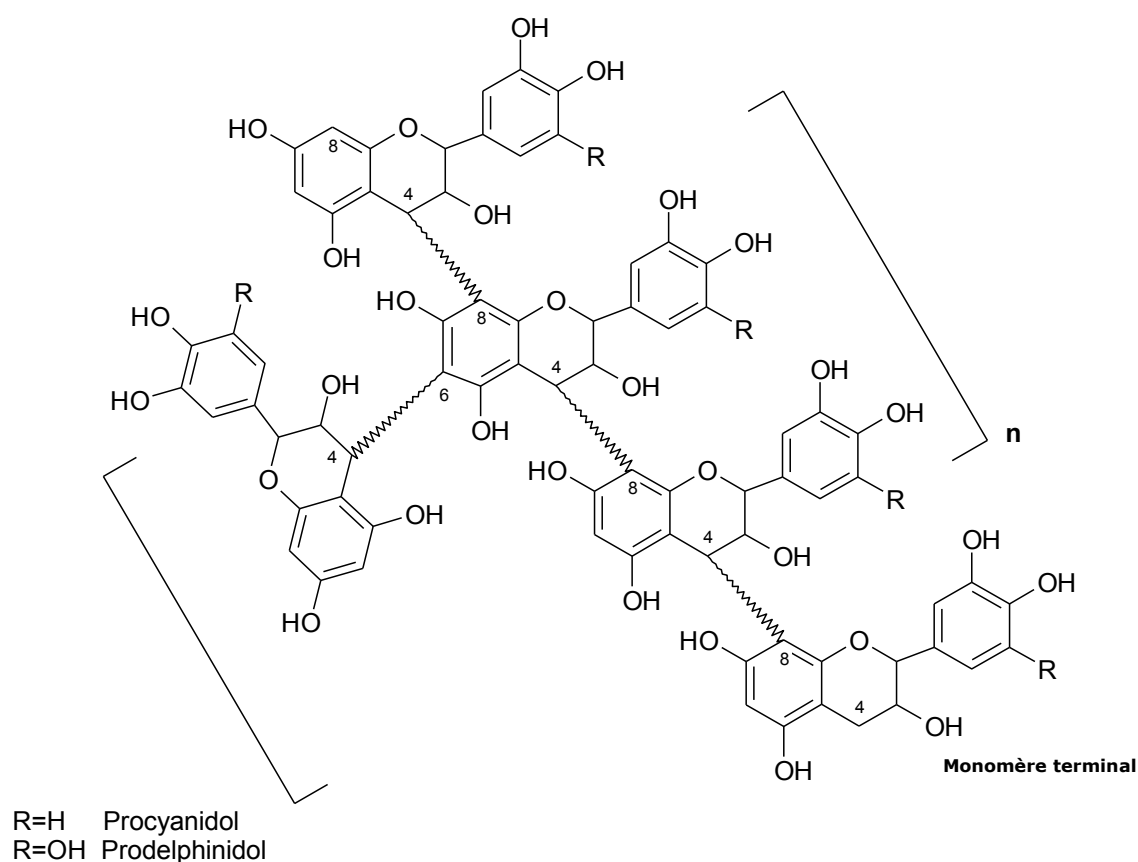
Le degré de polymérisation des TCs varie énormément selon la plante étudiée. Par exemple, les TCs du raisin contiennent des tannins composés de 2 à 17 monomères (Prieur et al, 1994) alors que ceux du sainfoin sont principalement composés de 5 à 8 monomères (Koupai-Abyazani et al, 1993). Des TCs à plus haut degré de polymérisation existeraient aussi mais leur insolubilité rend leur analyse difficile et leur activité biologique questionable (Mueller-Harvey, 2006).

#### 4.2.2.c. Biosynthèse des tannins condensés

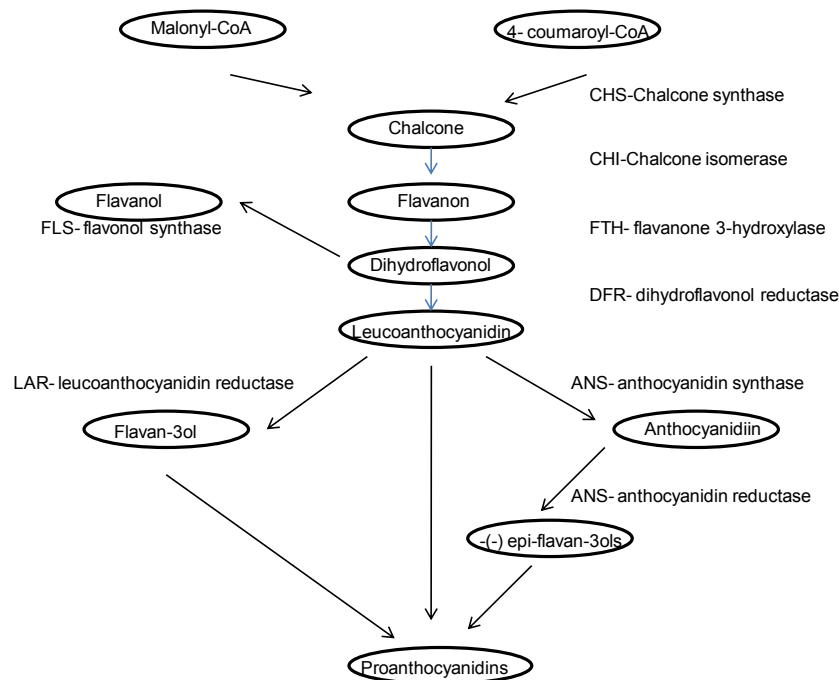
Biogénétiquement, les flavan-3-ols et les TCs sont issus de la voie métabolique du phénylpropanoïde (Weisshaar et Jenkins, 1998), qui conduit globalement à la synthèse des flavonoïdes (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999). Néanmoins, bien qu'en général, la voie de biosynthèse des flavonoïdes soit bien connue, les étapes de condensation et de polymérisation des TCs restent mal identifiées (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Hagerman, 2002). Les précurseurs de la synthèse des flavonoïdes sont la phénylalanine et l'acétate (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992). Les premières étapes de la synthèse des flavan-3-ols seraient communes à celles des anthocyanes et auraient lieu dans le cytoplasme des cellules végétales, alors que la maturation et la polymérisation des TCs aurait lieu dans les vacuoles (Aerts et al, 1999; Waghorn, 2008) (Figure 5).

Chimiquement, la formation des TCs implique des flavan-3,4-diols qui sont des molécules très réactives, et qui réagissent sur les carbones nucléophiles en position 8 ou 6 d'un flavan-3-ol (Bruneton, 1999; Schofield et al, 2001).

**Figure 4. Modèle de structure branchée des tannins condensés (Bruneton, 1999; Hagerman, 2002).**





**Figure 5. Etapes de la biosynthèse des tannins condensés.**

### 4.3. Propriétés des tannins

Par leur structure biochimique, les tannins présentent de nombreux groupes hydroxyles et phénoliques qui sont à l'origine de leur aptitude à complexer de nombreuses macromolécules, en particulier les protéines, mais aussi des hydrates de carbone, ou des ions métalliques (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bravo, 1998). Ces propriétés biochimiques expliquent en grande partie leurs activités biologiques spécifiques.

#### 4.3.1. Propriétés physico-chimiques des tannins

##### 4.3.1.a. Solubilité

La solubilité des tannins dans l'eau dépend de leur PM et de leur degré de polymérisation (Jean-Blain, 1998; Bruneton, 1999). Les tannins sont également solubles dans l'acétone et les alcools, ce qui explique que l'optimum de rendement d'extraction soit généralement obtenu par des solutions acétone-eau ou méthanol-eau (Makkar, 2000).

#### 4.3.1.b. Formations de complexes avec les protéines

Les tannins se fixent à la quasi-totalité des protéines et forment ainsi des complexes insolubles dans des conditions de pH physiologique (pH = 7 à 7,4) (Zimmer et Cordesse, 1996). Outre la formation de liaisons directes avec des protéines, les tannins contribuent aussi à créer des « ponts » entre les protéines, ce qui favorise leur précipitation (Zimmer et Cordesse, 1996; Bruneton, 1999).

Le degré de complexation tannins-protéines dépend de la structure et de la configuration tridimensionnelle des deux types de molécules en cause (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Waterman, 1999; Poncet-Legrand et al, 2006).

- pour les tannins, un PM trop fort et l'encombrement stérique en découlant limitent leur fixation aux protéines (Hagerman, 1992; Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998). La nature chimique (composition) des tannins influence aussi leur liaison aux protéines (Bravo, 1998; Feucht et Treutter, 1999; Waterman, 1999; Bennick, 2002).
- pour les protéines, les tannins montrent une forte affinité pour les protéines de conformation ouverte, de PM supérieur à 20kDas et qui sont riches en acides aminés hydrophobes comme la proline et l'hydroxy-proline (Hagerman, 1992; Zimmer et Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998).
- enfin, la formation des complexes tannins-protéines dépend aussi étroitement des conditions environnementales, tels le pH, la température, la force ionique ou la présence de molécules compétitrices. Notamment, la précipitation des protéines est favorisée par un environnement proche de leur pH isoélectrique (Hagerman, 1992; Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Zimmer et Cordesse, 1996) En fonction de ces conditions, deux types de complexation sont distingués :

##### ✓ Une complexation réversible

En conditions non oxydantes et dans la gamme de pH proche de 7, les interactions entre tannins/protéines s'établissent sur la base de liaisons réversibles (liaisons hydrogènes ou d'interactions hydrophobes) (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Zimmer et Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Bennick, 2002; Hagerman, 2002; Poncet-Legrand et al, 2006). Ce mécanisme de complexation de surface paraît non spécifique.

##### ✓ Une complexation irréversible

Lors de stress oxydatif, les fonctions phénols des tannins ont tendance à s'auto-oxyder en O-quinones. Ces dernières interagissent avec les protéines par des liaisons covalentes irréversibles (Bruneton, 1999; Feucht et Treutter, 1999).

La stabilité des complexes „tannin/protéine’ dépend également des conditions du milieu. Elle serait maximale dans une gamme de pH compris entre pH 3,5 et 7,0 (Jones et Mangan, 1977).

En deçà ou au-delà, les liaisons seraient beaucoup moins stables favorisant la libération de tannins libres aptes à se complexer avec de nouvelles molécules.

#### **4.3.2. Propriétés biologiques des tannins**

Elles découlent des propriétés physico-chimiques décrites précédemment.

##### **4.3.2.a. Inhibition des enzymes**

La capacité des tannins à complexer les protéines inclut l'inactivation possible d'enzymes soit directement, par fixation aux sites actifs, soit indirectement par l'encombrement stérique créé par la fixation des molécules de tannins sur l'enzyme ou par interférence avec le substrat potentiel de nature protéique (Zimmer et Cordesse, 1996).

##### **4.3.2.b. Activité anti-oxydante**

Grâce à leurs fonctions phénoliques, qui ont un fort caractère nucléophile, les tannins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres et de nombreux tannins présentent ainsi des propriétés anti-oxydantes (Bruneton, 1999; Feucht et Treutter, 1999; Hässig et al, 1999; Lim et al, 2007). Les radicaux libres, tels les ions ferreux ou cupriques sous forme libre, sont des espèces chimiques instables et très réactives. Ils perturbent le processus de réplication de l'ADN, induisant des mutations cancérigènes. Ainsi, les activités antimutagènes et anticancéreux attribuées à certains tannins ont été associées à leurs propriétés anti-oxydantes (Chung et al, 1998; Jung et Ellis, 2001; Richelle et al, 2001).

##### **4.3.2.c. Effet antiseptique**

Certains remèdes phytothérapeutiques riches en tannins présentent des effets antimicrobiens (Chung et al, 1998; Hatano et al, 2005; Song et al, 2006), antifongiques (Baba-Moussa et al, 1999; Bruneton, 1999) ou antiviraux (Chung et al, 1998; Yamaguchi et al, 2002; Song et al, 2005) Cette activité thérapeutique reconnue explique l'inscription des tannins comme antiseptique dans la pharmacopée médicale (Bruneton, 1999).

#### **4.4. Les plantes riches en tannins**

- **Les plantes riches en tannins hydrolysables**

Les THs sont présents chez plusieurs familles d'Angiospermes de Dicotylédones et chez quelques familles de Fagaceae, d'Anacardiaceae et de Geraniaceae (Bruneton, 1999). Par contre, ils sont absents des Gymnospermes et des Monocotylédones (Jean-Blain, 1998).

#### ➤ Les plantes riches en tannins condensés

De manière générale, les TCs sont plus largement répandus dans le règne végétal que les THs (Jean-Blain, 1998), puisque les TCs se rencontrent à la fois chez les Angiospermes et les Gymnospermes (Bruneton, 1999).

Certaines espèces de Pinaceae, de Fagaceae (chêne et châtaignier), de Rosidae (acacia) et de Rosaceae (pommier, fraisier, ronces) contiennent de fortes quantités de TCs (> 5% de la MS). Parmi les Fabaceae (Légumineuses), certaines espèces fourragères, comme le sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*), le sulla (*Hedysarum coronarium*) et les lotiers pédonculé et corniculé (*Lotus pedunculatus* et *L.corniculatus*), contiennent des TCs en quantité non négligeable (2 à 5% de la MS). A l'inverse, le contenu en TCs est en quantités non détectables chez d'autres espèces de légumineuses, comme la luzerne (*Medicago sativa* L.) ou les trèfles (*Trifolium* sp), ou encore chez des représentants de la famille des Poaceae (les graminées), tel le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.).

#### 4.5. Rôle des tannins chez les plantes

Les tannins comme métabolites secondaires des végétaux (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999), ne sont pas impliqués dans la croissance ou la reproduction des plantes, mais ils jouent un rôle dans leur défense face aux agressions par divers phytopathogènes. Ainsi, une accumulation de tannins a été observée lors d'infections de plantes par des bactéries, des champignons ou des nématodes, ce qui contribuerait à inhiber le développement de ces pathogènes (Feucht et Treutter, 1999; Collingborn et al, 2000). Les tannins sont aussi une défense contre les agressions dues à des prédateurs comme les insectes mais aussi des herbivores (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Woodward et Coppock, 1995; Feucht et al, 1997). Il a ainsi été montré que l'ingestion de tannins provoque des lésions dans le tube digestif d'insectes phytophages (Ayres et al, 1997). La présence excessive de tannins réduit aussi l'appétence de plantes pour les herbivores en raison de la sensation d'astringence liée à leur consommation, ce qui conduit alors à un arrêt de la consommation et protège ainsi les végétaux d'un excès de prédation (Jean-Blain, 1998; Bennick, 2002).

#### 4.6. Localisation des tannins dans les tissus végétaux

Tous les organes des plantes peuvent contenir des tannins, mais la localisation principale diffère selon les plantes en cause. De manière générale, les tannins sont majoritairement stockés dans les tissus épidermiques et sub-épidermiques, des feuilles mais ils sont aussi trouvés dans le péricarpe des fruits et des racines. Au niveau cellulaire, les THs sont majoritairement présents dans les parois cellulaires et les espaces intracellulaires, alors que les TCs sont surtout stockés dans des vacuoles intracellulaires sous forme libre et, en proportion variable, liée aux fibres (lignine) des parois cellulaires ou aux protéines cellulaires (Terrill et al, 1992b; Frutos et al, 2002).

Pour une même espèce végétale synthétisant des TCs et des THs, il peut y avoir une distribution différente de ces composés selon les organes (Jean-Blain, 1998).

## **5. Effets des tannins chez les ruminants non-parasités**

La consommation de plantes riches en tannins induit des effets contradictoires chez les ruminants. Il importe de distinguer les effets produits par les THs de ceux dus aux TCs mais aussi de prendre en compte les variations liées aux concentrations des tannins présents dans la ration des herbivores.

Les THs peuvent être responsables d'intoxications sévères voire mortelles (Jean-Blain, 1998). A l'inverse, les TCs sont en général considérés comme étant moins toxiques, rarement responsables de cas létaux, en particulier chez les ruminants.

### **5.1. Effets des tannins hydrolysables**

Les intoxications sévères de diverses espèces animales après ingestion excessive de plantes riches en THs ont été attribuées surtout à la présence de gallotannins (Mc Sweeney et al, 2001; Makkar, 2003; Zhu et al, 1992; Reed, 1995; Butter et al, 1999; Norton, 1999; Min et al, 2003; Mueller-Harvey, 2006). Chez les ruminants, les THs hydrolysés par des bactéries ruminales provoquent la libération d'acides galliques qui sont ensuite décarboxylés en pyrogallol, convertis ensuite en resorcinol (Singh et al, 2001; Min et al, 2003). Ces métabolites (résorcinol et punicalagin), qui sont hépato- et néphro-toxiques, sont ensuite absorbés dans le sang (Mueller-Harvey, 2006). Toutefois, il a été montré que la toxicité des THs dépendait de la qualité (structure chimique, PM) et de la quantité (dose) des THs ingérés (Zhu et al, 1992; Frutos et al, 2004).

### **5.2. Effets des tannins condensés**

Pour les TCs, le principe énoncé par Paracelse, (« la dose seule fait le poison ») reste valide, puisque des effets néfastes sur la production et la santé des animaux ont été observés uniquement lors d'ingestion massive de ressources riches en TCs.

A l'inverse des THs, les TCs sont rarement associés à une toxicité aigüe chez les ruminants (Butter et al, 1999). Un apport faible à modéré a été associé à des effets favorables alors que l'ingestion de teneur élevées en TCs aboutit à des effets néfastes sur les paramètres zootechniques, la physiologie digestive et la santé des animaux (Aerts et al, 1999; Butter et al, 1999; Mbhata et al, 2002; Hervas et al, 2003; Min et al, 2003; Waghorn et Mc Nabb, 2003). En conséquence, trois types de conséquences zootechniques peuvent être identifiés selon la teneur en TCs de la ration (Aerts et al, 1999; Barry et Mc Nabb, 1999; Paolini, 2004).

### **5.2.1. Absence d'effet sur l'ingestion volontaire d'aliments**

La mastication des plantes par l'animal provoque la rupture des parois des cellules végétales ce qui libère en conséquence les TCs des vacuoles dans la bouche de l'animal. En raison de la sensation d'astringence associée, cette libération induit des effets sur l'ingestion volontaire d'aliments et peut modifier les fonctions ruminales et post-ruminales. Toutefois, pour les légumineuses tempérées dont la teneur en TCs est faible à modérée (<4 à 5% de la MS), la consommation d'aliments est peu modifiée (Waghorn et al, 1987; Terrill et al, 1992a) et provoque par ailleurs des effets plutôt favorables sur les processus physiologiques post-ingestifs.

### **5.2.2. Effets sur la digestion des aliments**

Les TCs affectent les différentes étapes de la digestion au niveau ruminal et post-ruminal, ce qui explique leurs conséquences associées sur les divers aspects de la production des grands et des petits ruminants.

#### **➤ Effets sur les fermentations intra-ruminales:**

Le rumen se caractérise par un pH de 6 à 7. A cette gamme de pH, les complexes entre TCs et protéines sont stables (Aerts et al, 1999; Butter et al, 1999) et contribueraient à protéger les protéines des dégradations ruminales. La formation de complexes entre TCs et protéines alimentaires ou leur fixation aux enzymes bactériennes réduisent globalement la protéolyse ruminale (Zimmer et Cordesse, 1996; Jean-Blain, 1998; Aerts et al, 1999; Theodorou et al, 1999; Min et al, 2003). L'une des premières conséquences de ces phénomènes est de limiter la production et l'excrétion de méthane et d'ammoniaque (Mc Nabb et al, 1993; Theodorou et al, 1999; Hess et al, 2006a; Hess et al, 2006b; Animut et al, 2008).

#### **➤ Effets post-ruminaux :**

La protection de la dégradation des protéines alimentaires dans le rumen conduit à une augmentation du flux de protéines assimilables (PDIA) dans l'intestin et en conséquence, une

absorption accrue d'acides aminés (Mc Nabb et al, 1993; Barry et Mc Nabb, 1999; Theodorou et al, 1999; Makkar, 2003; Min et al, 2003; Waghorn, 2008). Selon Butter et al, (1999), le pH acide de l'abomasum induit une dissociation des complexes TCs-protéines, et la libération des protéines et des acides aminés, permettant ainsi leur digestion et leur absorption au niveau intestinal (Zimmer et Cordesse, 1996; Butter et al, 1999; Mc Sweeney et al, 2001; Mc Sweeney et al, 2008; Waghorn, 2008). Une augmentation de 50% du flux d'azote post-ruminal a ainsi été mesurée chez des moutons consommant du lotier corniculé par rapport à des témoins (Waghorn et al, 1987).

### 5.2.3. Amélioration des productions

Il a été montré que la consommation de plantes contenant des TCs (*L. corniculatus*) en quantité modérée influe sur la croissance d'agneaux (Aerts et al, 1999; Leathwick et Athkinson, 1996; Waghorn et Mc Nabb, 2003; Ramírez-Restrepo et al, 2005a; Rochfort et al, 2008) ou de veaux (Moore et al, 2003). L'ingestion à faible niveau de TCs influence aussi le niveau de production et la qualité du lait (Aerts et al, 1999; Min et al, 2003; Molle et al, 2003; Waghorn et Mc Nabb, 2003; Rochfort et al, 2008). Ainsi, la consommation de lotier corniculé (*L. corniculatus*) ou de sulla (*H. coronarium*) a été associée à une augmentation de production laitière chez les bovins ou chez les ovins (Min et al, 2003; Leto et al, 2002). Par ailleurs, une augmentation du taux protéique de 10% chez des vaches et de 12% chez des brebis ingérant des TCs, ainsi que du taux de lactose (14% chez les brebis), a été constatée par rapport aux animaux témoins (Aerts et al, 1999; Min et al, 2003; Rochfort et al, 2008; Leto et al, 2002). Enfin, un apport modéré de TCs, (de 2 à 4% de la ration), a été associé à une augmentation de la production de laine. Par exemple, la consommation de lotier corniculé a induit une augmentation de 11% de la production chez des ovins (Luque et al, 2000), qui serait liée à une absorption accrue d'acides aminés, en particulier de cystéine, indispensable pour la synthèse de la laine (Mc Nabb et al, 1993).

#### ✓ **Amélioration des performances reproductives**

Seules quelques études ont examiné les effets potentiels des TCs sur la reproduction des ruminants. La plupart d'entre elles ont montré que la consommation d'une légumineuse fourragère, notamment du lotier corniculé, riche en TCs induisait une augmentation du taux d'ovulation des brebis (Min et al, 2001; Rochfort et al, 2008; Luque et al, 2000). Ainsi, une corrélation positive entre le nombre de jours de pâture sur du lotier corniculé (2 à 3% TCs) et le taux d'ovulation des brebis a été mentionnée (Ramírez-Restrepo et Barry, 2005b).

#### 5.2.4. Effets sur la santé des animaux

##### ➤ Prévention de la métérorisation spumeuse

Chez les ruminants, la métérorisation spumeuse résulte d'une accumulation de gaz, issus de fermentations ruminales exacerbées, séquestré dans une mousse stable formée à partir des protéines solubles de la ration (Aerts et al, 1999; Waghorn et Mc Nabb, 2003; Rochfort et al, 2008). Ce désordre sanitaire est rencontré lors de consommation de légumineuses riches en protéines, comme le trèfle (*Trifolium repens*) ou la luzerne (*Medicago sativa*). A l'inverse, la consommation modérée de plantes riches en TCs, (de l'ordre de 0,5% de la MS) notamment de légumineuses fourragères, a été associée à une prévention des risques de métérorisation (Min et al, 2003; Ramírez-Restrepo et Barry, 2005b; Rochfort et al, 2008; Waghorn, 2008). Ceci s'expliquerait par la complexation des TCs avec les protéines alimentaires aboutissant à des réductions des fermentations ruminales (Zimmer et Cordesse, 1996; Waghorn et Mc Nabb, 2003). Les TCs inhiberaient aussi la croissance et la multiplication des micro-organismes du rumen par leur fixation aux constituants des parois cellulaires, bloquant ainsi le transport moléculaire vital pour le micro-organisme, ou agrégeant des cellules entre elles ce qui bloquerait leur division (Pell et al, 1999; Mc Sweeney et al, 2008).

##### ➤ Prévention des épisodes de diarrhées

La consommation de fourrages riches en TCs a généralement été associée à une augmentation de la matière sèche des fèces ce qui contribue à éviter les épisodes diarrhéiques (Min et al, 2001; Waghorn et Mc Nabb, 2003), ainsi que les risques de myases cutanées chez les ovins dues aux souillures de l'arrière train (Larsen et al, 1994; Leathwick et Athkinson, 1996; Waghorn et Mc Nabb, 2003).

##### ➤ Effets sur le parasitisme gastro-intestinal

Le troisième effet bénéfique des TCs sur la santé des ruminants concerne les nématodes GIs (Min et Hart, 2003; Waghorn et Mc Nabb, 2003; Hoste et al, 2006). Ces effets favorables sont au centre de cette thèse et seront plus largement exposés dans les chapitres suivants.

#### 5.3. Effets néfastes des tannins condensés

Chez les ruminants, des effets néfastes sur la physiologie digestive et les paramètres zootechniques ont aussi été répertoriés lors de consommation en trop forte quantité de TCs.



### 5.3.1. Réduction de l'ingestion volontaire des aliments

La consommation excessive de plantes à teneur élevée en TCs (>10% TCs de la MS) conduit à la réduction de l'ingestion volontaire (Barry et Mc Nabb, 1999; Harborne et Williams, 2000), expliquée par une aversion pour le fourrage (Butter et al, 1999). Ainsi, l'incorporation de quebracho, à la dose de 1,5g/jour, à la ration de petits ruminants a été associée à une réduction de prise alimentaire (Landau et al, 2000; Clauss et al, 2003).

Cette réduction d'ingestion serait due à divers phénomènes. En premier lieu, l'astringence, c'est à dire la sensation d'assèchement de la cavité buccale, résultant de la complexation des TCs avec les protéines salivaires, notamment avec les protéines riches en proline (PRPs) (Butter et al, 1999; Gilboa et al, 2000; Bennick, 2002; Haslam, 2007; Rochfort et al, 2008). Le deuxième processus résulterait d'une sensation de malaise post-ingestif. Enfin, l'hypothèse a été émise que l'ingestion de TCs perturberait également le système hormonal contrôlant la prise d'aliment volontaire (Zimmer et Cordesse, 1996).

### 5.3.2. Effets sur la physiologie digestive

Au niveau ruminal, la complexation des TCs en excès avec les protéines et les fibres alimentaires les rendrait moins digestibles (Butter et al, 1999; Mueller-Harvey, 2006; Mc Sweeney et al, 2008). La digestibilité dans le rumen serait aussi réduite en raison d'une baisse globale d'activité enzymatique de la flore (Mc Sweeney et al, 2001). La consommation de TCs affecterait ainsi la production d'acides gras volatils et leur absorption (Butter et al, 1999; Mueller-Harvey, 2006; Mc Sweeney et al, 2008).

Ingérés en grande quantité, les TCs affectent l'intégrité structurelle des muqueuses digestives. Des pertes de cellules épithéliales et des signes de dégénérescences et d'ulcérations ont été observés chez des ovins ingérant de fortes doses de quebracho (16% de la ration) (Hervas et al, 2003). Chez les caprins, des concentrations excessives de TCs dans la ration ont également été associées à une kératinisation des épithéliums digestifs (Mbhata et al, 2002). Ces modifications structurelles dans l'intestin, dues aux TCs affecteraient les processus de digestion d'une part en interagissant avec les protéines de membrane des entérocytes et en diminuant ainsi l'absorption de nombreuses molécules. De plus, la fixation à des enzymes spécifiques pourrait affecter les dernières étapes de la digestion pour de nombreux métabolismes (Zimmer et Cordesse, 1996; Butter et al, 1999; Mc Sweeney et al, 2001; Hervas et al, 2003; Waghorn, 2008).

### 5.3.3. Effets négatifs sur les paramètres zootechniques

Logiquement, la combinaison entre réduction d'ingestion volontaire et perturbation des phénomènes digestifs lors de présence élevée de TCs dans la ration a été associée à des baisses de production.

Une ingestion importante de TCs (>9% de la MS) a été associée à des effets négatifs sur la production de laine (Barry, 1985; Luque et al, 2000; Min et al, 2003; Ramírez-Restrepo et Barry, 2005b). Chez les bovins, une corrélation négative a été observée entre la consommation d'*Acacia boliviana* et de *Calliandra calothyrsus*, deux plantes tropicales à fortes teneurs en TCs, et la production de lait (Maasdorp et al, 1999). Par ailleurs, chez des chèvres élevées dans un environnement de plantes arbustives riches en TCs, l'administration d'un inhibiteur de tannins (le polyéthylène glycol, PEG) a conduit à une augmentation significative de production de lait (Decandia et al, 2000; Gilboa et al, 2000).

## 6. Effets des tannins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux, parasites des ruminants.

Depuis le début des années 1990, les effets des TCs sur le parasitisme GI des ruminants par des nématodes ont été abondamment étudiés car la consommation de plantes riches en TCs représente une méthode alternative/complémentaire à l'emploi répété d'AHs de synthèse dans la maîtrise de ces parasitoses digestives (Niezen et al, 1996; Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Min et Hart, 2003; Paolini, 2004; Waller et Thamsborg, 2004; Nguyen et al, 2005; Ramírez-Restrepo et Barry, 2005b; Githiori et al, 2006; Hoste et al, 2006; Ketzis et al, 2006; Pattra, 2007).

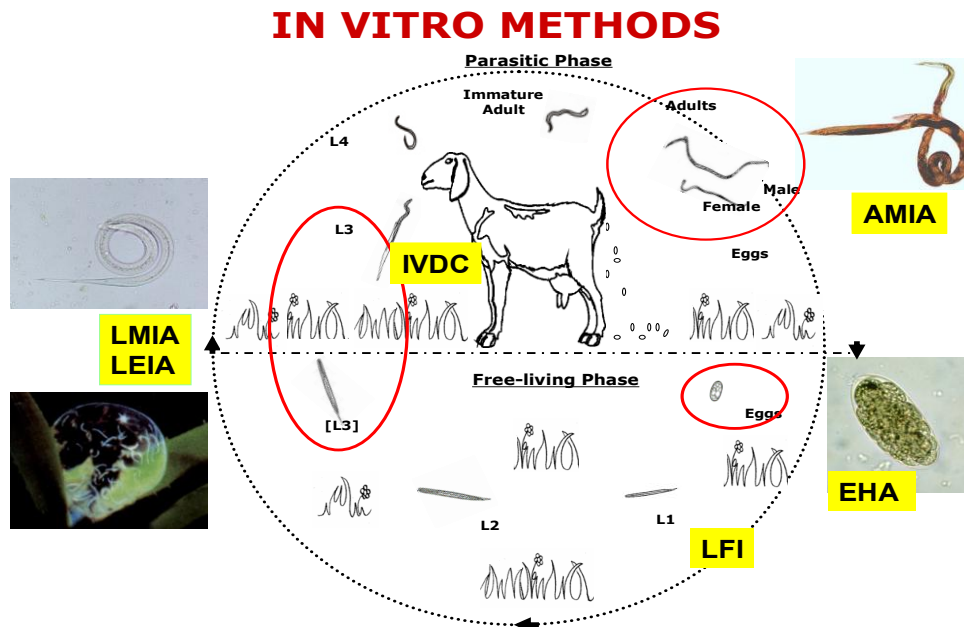
L'intérêt principal a porté sur des légumineuses fourragères tempérées, telles les lotiers pédonculé (*Lotus pedunculatus*) ou corniculé (*L.corniculatus*), le sulla (*Hedysarum coronarium*), le sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*), la dorycnie (*Dorycnium rectum*) ou le sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*), dont les propriétés AHs ont été confirmées dans plusieurs études (Niezen et al, 2002; Marley et al, 2003; Shaik et al, 2006; Heckendorn et al, 2006, 2007; Hoste et al, 2006). Le fait que ces légumineuses présentent la particularité d'avoir une teneur modérée en TCs tout en étant dépourvues de THs (Mueller-Harvey, 2006; Hoste et al, 2006) a contribué à fortement incriminer le rôle des TCs dans les effets observés et aussi d'envisager une toxicité limitée. Des études plus récentes ont aussi intégré les effets de plantes appartenant à d'autres familles botaniques des zones tempérées ou tropicales, consommées par les ovins et les caprins, qui présentent des teneurs en TCs modérées à élevées (Paolini et al 2004; Ademola et Idowu, 2006; Akkari et al, 2008a, b; Alonso-Diaz et al, 2008).

Dans certains cas, le rôle des tannins dans les effets observés a été souligné par l'emploi d'inhibiteur soit *in vitro* soit *in vivo* (Brunet et al, 2008)

### 6.1. Etudes *in vitro* : mises en évidence des effets AHs

De multiples études *in vitro* ont été appliquées pour évaluer l'efficacité AHs d'extraits de plantes riches en tannins, ainsi que pour incriminer le rôle des TCs dans les effets observés. De manière générale, ces tests ont été développés à partir de ceux mis au point pour mesurer l'efficacité des AHs de synthèse (Wood et al, 1995) (Figure 6).

Figure 6. Illustration des principaux tests *in vitro* employés pour mesurer l'effet anthelminthique d'extraits de plantes en relation avec les différents stades du cycle. EHA : Egg Hatch Assay, LFIA : Larval Feeding Inhibition Assay, LMIA : Larval Migration Inhibition Assay, LEIA : Larval Exsheathment Inhibition Assay, IVDC : *In Vitro* Direct Challenge, AMIA : Adult Mobility Inhibition Assay.



Ces tests *in vitro* ont pour principal avantage de permettre un criblage rapide, standardisé de multiples échantillons. La plupart d'entre eux sont reproductibles, sensibles et assez fiables (Jackson et Hoste, 2010). L'interprétation de leurs données repose sur l'hypothèse d'un effet direct de type pharmacologique des TCs sur les vers. Les concentrations en TCs appliquées lors des tests *in vitro* correspondent aux gammes de concentration en tannins et TCs mesurées *in vivo* (Terrill et al, 1994; Molan et al, 2003b). Néanmoins, les résultats *in vitro* sont obtenus en dehors du contexte physiologique et immunologique rencontré chez l'hôte et ne peuvent représenter en aucune manière une prédiction des effets *in vivo*. Des vérifications sur l'animal sont donc nécessaires.

Dans cette partie, nous avons analysé les résultats *in vitro* selon deux démarches :

1) l'étude des effets des TCs sur les différents stades parasitaires (œufs, L3s, adultes) des principales espèces de nématodes GIs rencontrées chez les petits ruminants (*H.contortus*, *T.colubriformis* et *T.circumcincta*),

2) l'étude des résultats tendant à établir le rôle spécifique des TCs dans les effets constatés. En général, l'effet d'extraits totaux de plantes riches en tannins a d'abord été évalué. Puis, dans le but de préciser le rôle des tannins dans les effets observés, des inhibiteurs de tannins ont été appliqués à ces mêmes extraits. Enfin, le rôle des TCs dans les effets AHs a parfois été confirmé par l'emploi de TCs purifiés et de flavan-3-ols, les monomères des TCs.

### 6.1.1. Extraits totaux de plantes légumineuses

Plusieurs études fondées sur des extraits de sainfoin, de sulla et de lotiers ont confirmé des effets significatifs au travers d'essais EHA, (Molan et al, 2002), LDA (Molan et al, 2002) ou de tests LMI appliqués sur *T.circumcincta*, *H.contortus* et *T.colubriformis* (Molan et al, 2000a et 2003a; Paolini et al, 2004; Barrau et al, 2005), ainsi que sur des L3s de nématodes GIs des cervidés (Molan et al, 2000b et 2003a). De même, l'incubation de L3s avec des fluides ruminiaux et abomasaux d'ovins ayant consommé du sulla a conduit à des inhibitions significatives de migration des larves des trois principales espèces de nématodes parasites des petits ruminants (Molan et al, 2000a). Enfin, il a aussi été montré que des extraits de sainfoin affecteraient la survie de vers adultes de *T.circumcincta* et *H.contortus* (Paolini et al, 2004).

### 6.1.2. Extraits de plantes ligneuses tempérées

Les premières études *in vitro* (Paolini et al, 2004) ont porté sur des plantes composant le couvert des zones méditerranéennes [chêne (*Quercus robur*), de ronce (*Rubus fruticosus*), ou de noisetier (*Coryllus avellana*)], exploitées par les petits ruminants, notamment les caprins. Elles ont montré que ces extraits inhibaient la migration des L3s et la mobilité des vers adultes de *T.circumcincta*, de *H.contortus* et de *T.colubriformis*. Néanmoins, des variations d'effets ont été constatées en fonction de la ressource, de l'espèce et du stade des parasites. Bahuaud et al, (2006) ont ensuite confirmé avec les extraits d'autres plantes ligneuses [pin (*Pinus sylvestris*), de bruyère (*Erica erigena*) ou de châtaignier (*Castanea sativa*)] un effet AH fondé sur le test de LEIA appliqué aux L3s de *T.colubriformis* et *H.contortus*.

### 6.1.3. Extraits de plantes tropicales

Des études récentes se sont aussi intéressées à des extraits de plantes tropicales riches en tannins. Une inhibition de migration ou du dégagement des L3s d'*H.contortus* ou de

*T.colubriformis* a été associée à des extraits d'*Acacia pennatula* (Alonso-Diaz et al, 2008), ou à des extraits de bois d'acacias (Max et al, 2004) (2-3% de TCs) pour un test EHA, alors qu'aucun effet n'a été observé lors de tests AMI (Iqbal et al, 2007).

## 6.2. Role des tannins condensés dans les effets AHs constatés

### 6.2.1. Emploi d'inhibiteurs de tannins

Une des méthodes permettant d'objectiver le rôle des TCs dans les effets AHs observés a consisté à préincuber les extraits actifs avec des inhibiteurs de tannins et à vérifier ensuite si les propriétés AHs sont conservées (Makkar, 2000). Deux inhibiteurs plus ou moins spécifiques ont surtout été utilisés : le polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) (Barrau et al, 2005; Alonso-Diaz et al, 2008), qui est spécifique des tannins mais ne peut être appliqué qu'en conditions *in vitro* ou le polyéthylène glycol (PEG) (Molan et al, 2000a; Paolini et al, 2004) qui a l'avantage de pouvoir être employé à la fois en conditions *in vitro* et *in vivo*.

De manière générale, des restaurations vers des valeurs proches de celles des valeurs témoins ont été trouvées après addition de PEG ou de PVPP aux extraits dans les tests mesurant la migration et le dégainement des L3s ou la mobilité des vers adultes pour diverses espèces de trichostrongles (Paolini et al, 2004; Bahuaud et al, 2006; Alonso-Diaz et al, 2008). Cette annulation des effets AHs a été observée dans le cas d'extraits de légumineuses fourragères (Paolini et al, 2004; Barrau et al, 2005) et de plantes ligneuses tempérées (Paolini et al, 2004; Bahuaud et al, 2006) ou tropicales (Alonso-Diaz et al, 2008). De façon similaire, l'addition de PEG à du fluide ruminal d'animaux ayant consommé du sulla a aussi permis une restauration partielle des valeurs de migration larvaire, mais n'a eu aucun effet dans le cas de fluide abomasal (Molan et al, 2000a). Dans ce dernier cas, l'absence d'effet du PEG pourrait être due au pH abomasal acide qui affecterait les liaisons entre les TCs et les molécules de PEG.

Pour résumer, ces résultats suggèrent donc un rôle des tannins condensés dans les effets AHs. Plusieurs études ont ensuite cherché à confirmer ces résultats en examinant les effets de TCs purifiés à des degrés divers.

### 6.2.2. Effets de tannins condensés purifiés

#### 6.2.2.a. Extraits de quebracho

Le terme „quebracho' fait référence à un extrait d'écorces d'une ou de plusieurs espèces de *Schinopsis*, d'origine sud-américaine contenant de 50 à 80% de TCs (Streit et Fengel, 1994). En

raison de cette forte proportion, cette substance a été utilisée pour tester un certain nombre d'hypothèses sur le rôle des TCs dans les effets AHs sur les NGIs. En conditions *in vitro*, il a ainsi été montré qu'un extrait de quebracho (comprenant 73% de TCs et 19% de simples phénols) inhibait l'éclosion des œufs et le développement des larves de *T.circumcincta*, *H.contortus* et *T.vitrinus* (Athanasiadou et al, 2001b).

### 6.2.2.b. Tannins purifiés

Des études récentes ont montré que des extraits purifiés de TCs obtenus à partir de sainfoin (Barrau et al, 2005) ou de thé vert (*Camellia sinensis*) (Molan et al, 2004) réduisaient de manière significative la migration des L3s d' *H.contortus*, de *T.colubriformis* ou de *T.circumcincta*.

### 6.2.3. Monomères des tannins condensés

Un petit nombre d'études ont suggéré que des différences d'activité AH seraient liées aux différentes classes de tannins condensés, en particulier entre les prodelphinidines (PDs) et les procyanidnines (PCs) (Molan et al, 2003b; Brunet et Hoste, 2006). Aucune étude n'a examiné spécifiquement les effets distincts de PDs et de PCs en raison de la difficulté d'obtenir ces composés purifiés. Toutefois, quelques études ont comparé l'activité AH des monomères de base constitutifs de ces deux classes et des gallates correspondants. Les résultats concordants ont confirmé un effet plus marqué des monomères de PDs (épicatechines et épigallocatechines) par rapport à ceux des PCs (catéchines et gallocatéchines) (Molan et al, 2003b ; Brunet et Hoste, 2006).

Pour résumer, ces études *in vitro* ont confirmé l'effet AH de plantes riches en TCs sur les principales espèces de nématodes GIs des petits ruminants (*H.contortus*, *T.circumcincta*, *T.colubriformis*). Le rôle des TCs dans ces effets a été largement corroboré par l'usage d'inhibiteurs. Des variations dans les effets observés ont aussi été décrites selon la plante et le stade parasitaire impliqué.

Quelques essais menés chez des moutons ou des chèvres expérimentalement infestés ont ensuite cherché à vérifier les hypothèses issues des études *in vitro*.

## 6.3. Etudes en condition d'infestations expérimentales

### 6.3.1. Effets sur les larves 3 infestantes

Pour confirmer les résultats des études *in vitro* indiquant un effet significatif sur la biologie des L3s (migration et dégainement) de diverses espèces en présence de TCs, quelques études

*in vivo* ont eu pour but de vérifier si l'installation des L3s était modifiée dans un environnement digestif riche en TCs, lié à la consommation de ressources variées (quebracho, légumineuses tempérées ou tropicales riches en TCs) au moment des infestations. En présence de quebracho, des réductions d'installation larvaires de l'ordre de 65 à 70% ont été mises en évidence chez des chèvres infestées par *T.colubriformis* et *T.circumcincta* (Paolini et al, 2003c), des baisses d'installation non significative de l'ordre de 33% étant signalées pour *H.contortus* (Paolini et al, 2005b). Des effets comparables sur les processus biologiques initiaux des larves infestantes d'*H.contortus* ont également été trouvés après consommation d'une légumineuse tropicale riche en tannins, (*L.latisiliquum*), par des caprins (Brunet et al, 2008a)

Une variabilité similaire des résultats en fonction des espèces parasites impliquées a aussi été rapportée avec des plantes riches en TCs. Ainsi, avec des légumineuses tempérées, des réductions du nombre de vers adultes de *T.colubriformis* et de *T.circumcincta* ont été signalées chez des moutons pâturant du sainfoin avant l'infestation (Thamsborg et al, 2003). Par contre, la consommation de foin de sainfoin n'a eu aucun effet sur *H.contortus* (Paolini et al, 2005b). De même, Rios-De Alvarez et al, (2008) n'ont observé aucun effet significatif du sainfoin sur le nombre de *T.colubriformis* adultes chez des agneaux. Enfin, dans le cadre de protocole de réinfestation, une réduction du taux d'installation des L3s de *T.circumcincta* a été mesurée chez des ovins consommant du sulla (Tzamaloukas et al, 2005) alors que dans une étude similaire, le pâturage d'ovins sur du sulla, du sainfoin ou du lotier pédonculé n'avait pas affecté l'installation des L3s de *T.colubriformis* (Athanasiadou et al, 2005).

Pour les plantes tropicales, un seul résultat est disponible indiquant une réduction significative du nombre de vers adultes d'*H.contortus* mesurée chez des caprins consommant des feuilles d'acacia (Kahiya et al, 2003).

Dans le but de confirmer le rôle des TCs dans la réduction de l'installation des L3s de *T.colubriformis* et de *T.circumcincta*, une dose quotidienne de PEG a été administrée à des ovins pâturant du lotier pédonculé (Niezen et al, 1998b). Toutefois, aucune restauration significative des paramètres parasitologiques et zootechniques n'a été observée.

### 6.3.2. Effets sur les vers adultes

Les études sur les effets de TCs et de plantes riches en TCs sur des populations de vers adultes déjà installées sont beaucoup plus abondantes. Elles ont été réalisées en conditions expérimentales d'infestation ou lors de suivis d'infestations naturelles chez des animaux ayant accès ou non à des ressources riches en tannins.

De manière très générale, la première conséquence significative constatée porte sur la quantité d'œufs de nématodes excrétée. Selon les ressources exploitées (légumineuses fourragères ou plantes ligneuses) et l'espèce parasite en cause, cette baisse significative du



niveau d'OPG a été associée soit à une diminution des charges parasitaires, (Niezen et al, 2002; Thamsborg et al, 2003; Tzamaloukas et al, 2005; Heckendorn et al, 2006; Heckendorn et al, 2007), c'est-à-dire du nombre de vers retrouvés à l'autopsie, soit à une fertilité réduite des vers femelles adultes lorsque ce paramètre a été mesuré.

Ces données ont d'abord été obtenues dans le cas d'infestations expérimentales de moutons ou de chèvres recevant des extraits de quebracho (Athanasidou et al, 2000b et 2001b; Paolini et al, 2003a, 2003b) ou d'acacia (Max et al, 2004), correspondant à des formes concentrées de tannins.

Elles ont été aussi largement confirmées avec les principales légumineuses fourragères riches en tannins qui servent de modèles d'études dans le monde. Dans un nombre restreint d'études, aucune différence significative d'excrétion d'œufs et de nombre de vers n'a été mise en évidence. Cela a été le cas chez des ovins consommant du sulla (Niezen et al, 2002; Athanasidou et al, 2005), du lotier pédonculé ou corniculé (Niezen et al, 1998a; Bernes et al, 2000; Athanasidou et al, 2005; Tzamaloukas et al, 2005), du sainfoin (Athanasidou et al, 2005) ou de la dorycnie (Waghorn et al, 2006). Cependant, ces résultats décevants trouvent souvent leur explication soit dans une quantité insuffisante de TCs présents dans la ressource consommée et dans la ration, soit dans des problèmes d'inappétence, soit enfin dans une distribution insuffisamment longue de la ressource.

En général, comme en conditions contrôlées, la consommation de légumineuses fourragères, tempérées (Marley et al, 2003; Paolini et al, 2003b; Pomroy et Adlington, 2006) ou tropicales (Lin et al, 2003; Terrill et al, 2007), a été associée à une réduction du niveau d'OPG chez les ovins et les caprins. Cette diminution des OPGs a été reliée à une réduction de la charge parasitaire (Niezen et al, 1995 et 1998a; Lange et al, 2006; Terrill et al, 2007), ou de la fertilité des vers femelles (Paolini et al, 2005a).

Enfin, les mêmes phénomènes (réduction globale d'excrétion d'œufs de parasites dues à un nombre de vers ou à une fertilité réduites) ont été rapportés chez les petits ruminants lors de consommation de plantes de régions tempérées ou tropicales appartenant à diverses familles botaniques, (dont les Fabacea), qui ont en commun leur richesse en polyphénols et en tannins. Par ailleurs, un ensemble d'études menées sur des caprins a montré que l'incorporation de diverses espèces de bruyères, notamment *Calluna vulgaris*, dans la ration contribuait à réduire le niveau de parasitisme par les trichostrongles, en particulier par la diminution des valeurs d'OPGs (Osoro et al, 2007a, b; Frutos et al, 2008)

En régions tropicales, des résultats similaires ont été signalés lors de consommation de feuilles de diverses espèces d'acacia en infestations expérimentales (Kahiya et al, 2003) ou naturelles (Cenci et al, 2007; Akkari et al, 2008a; Minho et al, 2008; Akkari et al, 2008b), de *Lysiloma latisiliquum*, une légumineuse arbustive du Mexique (Martinez Ortiz de Montellano, 2010), de *Leucaena leucophela* (Lin et al, 2003) ou de feuille de manioc (Rojas et al, 2006;



Nguyen et al, 2005; Sokerya et al, 2009). Lorsque, dans ces études, l'effet des TCs sur la charge parasitaire a été mesuré, la diminution des OPGs a été corrélée à des populations de vers réduites (Cenci et al, 2007; Akkari et al, 2008a; Minh et al, 2008).

Comme pour les études *in vitro*, le rôle des TCs, dans les effets observés, a été exploré par l'administration de PEG aux animaux parasités. Lors d'études de nutrition, le PEG a été très largement employé pour neutraliser les effets négatifs liés à la présence de tannins en grande quantité (Makkar et al, 1995; Rogosic et al, 2008; Waghorn, 2008). Les résultats obtenus dans le cas de parasitisme ont été contradictoires.

Dans une étude menée chez des chèvres consommant des espèces arbustives, (*Acacia sp.*, *Cadaba sp.* et *Carissa sp.*), Kabasa et al, (2001) ont montré que l'administration quotidienne de PEG était associée à des niveaux d'OPG supérieurs à ceux observés chez les chèvres ne recevant pas de PEG. De même, chez des ovins consommant des feuilles d'*Acacia mollissima*, l'administration de PEG a provoqué une augmentation significative des OPGs et un gain de poids journalier supérieur à ceux des animaux non traités (Akkari et al, 2008a). Cependant, à la dose de 40g de PEG par jour, aucune différence n'a été constatée (Akkari et al, 2008b).

#### **6.4. Effets sur la résilience des animaux**

Dans la plupart des études citées, la consommation des plantes contenant des TCs a été associée à une amélioration de la résilience de l'hôte par rapport aux témoins. Cet effet bénéfique a été mesuré au travers du statut clinique des animaux (diarrhées, nombre de traitements AHS nécessaires, mortalité) (Min et al, 2005), de mesures pathophysiologiques (Paolini et al, 2005a), ou portant sur les niveaux de production comme le gain de poids (Niezen et al, 1995), la production de lait (Hoste et al, 2005a) ou de laine (Niezen et al, 1998a). Par ailleurs, les légumineuses fourragères ont une haute valeur nutritive, ce qui peut aussi expliquer les meilleures performances observées chez les ruminants parasités lorsque ceux-ci consomment du sulla, du sainfoin ou du lotier (Githiori et al, 2006; Tzamaloukas, 2006).

#### **6.5. Modes d'action des tannins condensés sur les Nématodes gastrointestinaux**

Dans un cadre général, deux hypothèses sont classiquement proposées pour expliquer les effets des TCs sur les trichostrongles (Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Min et Hart, 2003; Min et al, 2003; Hoste et al, 2006) : soit un effet indirect par amélioration de la réponse immunitaire de l'hôte contre les vers, soit l'hypothèse d'un effet direct, de type pharmacologique, qui serait due aux propriétés intrinsèques des TCs sur les vers.

### 6.5.1. Effet indirect des tannins condensés

En raison du rôle protecteur des TCs vis-à-vis des dégradations ruminales des protéines, leur présence dans la ration en quantité modérée entraîne un afflux et une absorption accrue d'acides aminés dans l'intestin grêle (Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Min et al, 2003; Waghorn, 2008). Comme toute supplémentation protéique de la ration est généralement associée à une meilleure réponse de l'hôte contre les vers du tube digestif (Balic et al, 2000; Coop et Kyriazakis, 2001), il a été suggéré que l'effet antiparasitaire des tannins découlerait, au moins en partie, indirectement de cette amélioration de la réponse immunitaire dans les muqueuses (Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Min et al, 2003; Hoste et al, 2006; Ketzis et al, 2006).

Cependant, peu d'études ont cherché à objectiver cet effet indirect en comparant en parallèle à la consommation de plantes riches en tannins les modifications provoquées dans les cellules effectrices de la réponse locale dans les organes digestifs de l'hôte infesté. Les quelques études menées en ce sens ont fourni des données contradictoires.

Chez des ovins infestés par *T.circumcinta* et *T.colubriformis*, la consommation de sulla a été associée à une réduction de la charge parasitaire et une augmentation d'anticorps (Niezen et al, 2002). De même, par rapport aux animaux témoins, une augmentation du nombre des cellules inflammatoires (éosinophiles, globules leucocytes, mastocytes) des muqueuses abomasales a été notée chez des ovins expérimentalement infestés par *T.circumcinta* et consommant du sulla (Tzamaloukas et al, 2006) ou parasité par *T.colubriformis* et recevant du sainfoin (Rios-De Alvarez et al, 2008). Chez les caprins, une augmentation du nombre de cellules inflammatoires a aussi été associée à l'apport de quebracho lors d'infestations par *T.colubriformis* et *T.circumcinta* (Paolini et al, 2003c) mais pas avec *H.contortus* (Paolini et al, 2003a).

### 6.5.2. Effet direct des tannins condensés

Cette seconde hypothèse est soutenue par l'ensemble des résultats des études *in vitro*, puisque dans ces conditions, le rôle potentiel de facteurs dépendant de l'hôte est absent. En général, ces études *in vitro* ont montré que les TCs affectent les nématodes GIs quel que soit l'espèce, même si des variations d'effet selon le stade parasite ou la source de TCs existent.

Par ailleurs, les résultats de certaines études *in vivo*, tendent aussi à corroborer l'hypothèse d'un effet direct des TCs, c'est le cas des infestations de courte durée ou se déroulant chez des jeunes animaux naïfs qui constituent des circonstances peu propices à l'expression d'une réponse de l'hôte. (Athanasidou et al, 2000b et 2001b; Kahiya et al, 2003; Athanasidou et al, 2005; Shaik et al, 2006; Waghorn et al, 2006; Cenci et al, 2007; Paolini et al, 2003a; Paolini et al, 2003c).

Ces conséquences directes des TCs sur les Nématodes s'expliqueraient par leur aptitude générale à se lier aux protéines, notamment aux protéines parasitaires. Les perturbations des

propriétés physicochimiques en résultant affecteraient en conséquence la biologie des vers. La capacité des TCs à se fixer aux protéines et glycoprotéines de la cuticule des vers adultes ou de la gaine des larves infestantes (deux structures riches en proline et hydroxy-proline) ou aux enzymes secrétées par les vers et impliqué dans des fonctions essentielles et divers métabolisme (Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Min et al, 2003; Molan et al, 2003b; Hoste et al, 2006) a notamment été suggérée. Il a aussi été évoqué des interactions entre les TCs et l'épithélium digestif des nematodes, pouvant affecter les processus de digestion et l'ensemble de la nutrition des vers (Kahn et Diaz-Hernandez, 2000; Molan et al, 2003b, 2004 ; Brunet, Thèse 2008). Ces hypothèses se sont vues en partie confirmées par des études fonctionnelles et structurales réalisées chez des larves (Brunet et Hoste, 2006; Brunet et al, 2007; Brunet, Thèse 2008) ou chez des vers adultes (Martinez Ortiz de Montellano, Thèse 2010)

## 7. Variabilité des effets des tannins condensés

Les résultats des diverses études ont souligné que l'effet AH des TCs sur les nématodes GIs existe mais qu'il dépend aussi de plusieurs facteurs liés à l'hôte, au parasite et à la ressource contenant les TCs.

### 7.1. Facteurs liés à l'hôte

Jusqu'à présent, aucune étude n'a directement comparé, entre les deux espèces de petits ruminants, l'effet d'une même source de TCs sur les nématodes GIs dans un même protocole. Toutefois, les conditions voisines de certaines études chez les ovins et les caprins suggèrent l'existence de divergences d'effets des TCs sur le parasitisme GI en fonction de l'hôte.

Dans les cas d'infestations expérimentales par *T.colubriformis*, l'ingestion de quebracho a été associée à une réduction de la charge parasitaire chez les ovins (Athanasidou et al, 2000b) mais pas chez les caprins (Paolini et al, 2003c). De même, en infestations naturelles, la consommation de sulla frais a induit une réduction de la charge parasitaire chez les ovins (Niezen et al, 1995 et 1998a) mais pas chez les caprins (Pomroy et Adlington, 2006). Pour une même source de TCs, un effet AH existerait donc chez les ovins mais pas chez les caprins.

Ces différences selon l'hôte peuvent s'expliquer par les différences physiologiques entre les ovins et les caprins, décrits respectivement, en fonction de leurs comportements alimentaires, comme des brouteurs ou des cueilleurs. Or, par diverses adaptations physiologiques, les ruminants cueilleurs seraient capables d'ingérer de plus grande quantité de TCs que les brouteurs. L'absence d'effet AH d'une source de TCs chez les caprins pourrait s'expliquer par une diminution de la quantité de TCs libres dans le tractus digestif, due à leur piégeage par les protéines salivaires ou à leur inactivation par les bactéries ruminales.

## 7.2. Facteurs liés aux nématodes gastro-intestinaux

### 7.2.1. L'espèce parasite

*In vitro*, des résultats variables ont été obtenus selon l'espèce parasitaire. Certaines études ont montré un effet similaire du quebracho sur les espèces abomasales et intestinales (Athanasiadou et al, 2001b). A l'inverse, des différences de sensibilité pour une même source de TCs ont été observées entre les espèces abomasales et intestinales (Molan et al, 2004; Bahuaud et al, 2006) voire entre deux espèces abomasales (Paolini et al, 2004). Par exemple, pour une même concentration, un extrait de sainfoin a inhibé la migration des L3s d'*H.contortus* et de *T.colubriformis*, mais pas celle de *T.circumcincta* (Paolini et al, 2004).

Plusieurs études *in vivo* ont également souligné des variations d'effets selon l'espèce parasite impliquée. Néanmoins, les résultats obtenus sont contradictoires. Dans certaines études, des effets similaires ont été constatés pour les différentes espèces (*H.contortus*, *T.circumcincta* et *T.colubriformis*) (Shaik et al, 2006). Au contraire, dans d'autres, les effets différaient selon l'espèce parasite. En général, ces différences de sensibilité ont surtout été décrites entre les espèces abomasales, telles que *H.contortus* et *T.circumcincta*, et les espèces intestinales, telles que *T.colubriformis* et *N.battus*. Ainsi, l'administration de quebracho (8% de la ration alimentaire) à des ovins hébergeant des vers adultes a induit une réduction significative des populations de *T.colubriformis* et *N.battus* mais pas d'*H.contortus* et de *T.circumcincta* (Athanasiadou et al, 2001b). De même, lorsque le quebracho a été donné au moment des infestations par les L3s, des réductions de 65%, 30% et 70% de la charge parasitaire ont été mesurées respectivement pour *T.colubriformis*, *H.contortus* et *T.circumcincta* (Paolini et al, 2003c, 2005b).

Cette variabilité selon l'espèce parasite, observée *in vitro*, reflèterait des différences intrinsèques de sensibilité des nématodes GIs aux TCs. Pour les variabilités constatées *in vivo*, des différences de disponibilité des TCs libres selon l'organe digestif et en conséquence, d'exposition des vers à ces composés est une seconde hypothèse.

Comme mentionné, la disponibilité des TCs sous forme libre dépend du pH. Ainsi, en supposant un mode d'action direct des TCs sur les vers, le pH acide de l'abomasum induirait une libération des TCs, fixés aux protéines salivaires ou alimentaires (Butter et al, 1999). Néanmoins, l'établissement des interactions entre les TCs et les protéines, et la stabilité des complexes 'TCs-protéines' sont défavorisés aux pH acides (dans l'abomasum) alors qu'ils sont favorisés aux pHs proches de 7 (dans l'intestin) (Jones et Mangan, 1977; Bruneton, 1999).

### 7.2.2. Le stade parasitaire

Des variations non-négligeables d'efficacité ont aussi été décrites en fonction du stade parasitaire, au travers d'études menées *in vitro* ou *in vivo* comparant les effets des TCs sur les stades L3s et adultes des nématodes GIs.

*In vitro*, les L3s sont apparues plus sensibles à l'effet des TCs que les vers adultes puisque, par exemple, un extrait de sainfoin inhibe la migration larvaire mais pas la mobilité des vers adultes de *T.colubriformis* (Paolini et al, 2004).

Ces variations d'effet en fonction du stade parasitaire ont également été retrouvées dans des études *in vivo*. Chez les caprins, l'ingestion de quebracho n'a eu aucune incidence létale sur des populations de vers adultes alors qu'elle a été associée à une forte réduction d'installation des L3s mesurée par des baisses de charge parasitaire lorsque l'infestation a coïncidé avec l'ingestion des TCs (Paolini et al, 2003c). Un résultat similaire a été trouvé chez des ovins consommant du sulla (Tzamaloukas et al, 2005).

Ces différences de sensibilité pourraient s'expliquer par des particularités biologiques propres aux deux stades et des modes d'action divergents des TCs sur les L3s et les adultes.

### 7.3. Facteurs liés aux sources de tannins condensés exploités

De manière générale, l'effet AH observé en conditions naturelles ou expérimentales a été relié aux TCs. Cependant, des disparités ont été observées selon la ressource exploitée. A la fois la quantité et la qualité des TCs paraissent des facteurs importants à considérer.

#### 7.3.1. La quantité de tannins condensés

De nombreux résultats *in vitro* ont souligné l'importance de la concentration en TCs dans les effets AHs. De manière générale, des effets dépendant de la dose ont été obtenus (Molan et al, 2000a; Athanasiadou et al, 2001b; Paolini et al, 2004). Ainsi, une relation linéaire a été montrée entre la concentration en extrait de quebracho dans le milieu et la viabilité des L3s des trois principales espèces de vers (Athanasiadou et al, 2001b). De manière similaire, un effet dose-réponse a aussi été décrit par Molan et al, (2003b) concernant l'effet des flavan-3-ols, les monomères des TCs, sur le développement des œufs et la migration des L3s de *T.colubriformis*.

*In vivo*, la démonstration la plus probante de l'importance de la quantité de TCs ingérés a été obtenue par Athanasiadou et al, (2001b). Une relation entre la dose ingérée et l'effet du quebracho a été établie chez des ovins infestés par *T.colubriformis* et par *N.battus*, puisque le degré de réduction du niveau d'OPG et de la charge parasitaire était proportionnel à la dose de quebracho dans la ration.

Par ailleurs, une méta-analyse des résultats de plusieurs études a permis d'établir une relation dose/effet entre la teneur en TCs des sources exploitées et l'effet sur l'excrétion d'œufs de nématodes (Min et Hart, 2003).

### 7.3.2. La qualité des tannins condensés

La nature des TCs (ou qualité), au travers de leur structure (type de liaisons inter-flavaniques) et de leur composition biochimique (nature des monomères), modulerait également les propriétés AHs.

Les premiers, Molan et al, (2003b, 2004) ont suggéré que la structure chimique des flavan-3-ols, les monomères des TCs, serait un facteur important modulant les effets AHs. Il semblerait que le niveau d'inhibition soit corrélé au nombre de groupements phénoliques présents sur le cycle B des monomères (Molan et al, 2003b). Les flavan-3-ols composants les prodelphinidols (PDs) (tri-hydroxylés) se sont avérés plus actifs sur les L3s que ceux des procyanidols (PCs) (di-hydroxylés) (Molan et al, 2003b). A l'inverse, le ratio des conformations cis : trans est apparu sans influence sur l'activité AH (Molan et al, 2003b). Dans une revue récente, Waghorn et al, (2008) évoquent également des relations entre la structure et la composition des TCs et leur réactivité vis-à-vis du parasitisme GI. Il est reconnu que le niveau de complexation des TCs avec des macromolécules, telles que des protéines, dépendrait du PM, du degré de polymérisation et de la conformation des TCs (Waterman, 1999; Mueller-Harvey, 2006; Poncet-Legrand et al, 2006).

Ces résultats et les hypothèses afférentes suggèrent que les différences d'effets observées entre deux légumineuses fourragères ayant des teneurs en TCs similaires, s'expliqueraient par la nature de leurs TCs. En particulier, les plantes présentant des ratios PD:PCs élevés seraient les plus actives contre les vers (Min et Hart, 2003; Molan et al, 2003a, b; Hoste et al, 2006). Ainsi, des études ont montré que le lotier pédonculé était plus actif contre les nématodes que le lotier corniculé (Niezen et al, 1998a; Molan et al, 2000b). Cette différence aurait plusieurs origines. D'une part, les TCs des lotiers pédonculé et corniculé diffèrent par leurs masses (PMs) (respectivement 2200 et 1900 Da) et par la nature du monomère terminal (respectivement un épigallocatechol (PD) et un épicatechol (PC). D'autre part, ces deux espèces de lotier présentent des ratios PD:PCs différents (respectivement 70:30 et 27:73) (Foo et al, 1997 ; Min et al, 2003). De même, l'activité AH du sainfoin s'expliquerait par un ratio PD:PC élevé (de l'ordre de 70:30) et la présence d'un monomère de PDs en position terminale (Koupai-Abyazani et al, 1993; Marais et al, 2000; Barrau et al, 2005).

### 7.3.3. Implication de ces facteurs sur le mode de distribution des tannins condensés

L'importance de ces deux facteurs (quantitatif et qualitatif) en relation avec les ressources exploitées est essentielle à considérer dans le choix du mode de distribution des plantes bioactives aux animaux afin de permettre une conservation optimale des TCs initialement présents dans la plante fraîche et obtenir la meilleure efficacité contre les nématodes GIs (Rochfort et al, 2008).

Au travers des études citées, différents modes de distribution se sont avérés capables de préserver l'effet AH :

- en pâturage sur des légumineuses (Thamsborg et al, 2003; Min et al, 2004; Athanasiadou et al, 2005; Tzamaloukas et al, 2005);
- distribué en fourrage frais (Niezen et al, 1998b; Waghorn et al, 2006; Heckendorn et al, 2007) en foin (Paolini et al, 2003b; Hoste et al, 2005a; Paolini et al, 2005a; Heckendorn et al, 2006; Lange et al, 2006; Shaik et al, 2006), ou en ensilage (Heckendorn et al, 2006; Heckendorn, 2007) ;
- distribué sous forme de granulés (Terrill et al, 2007) ;
- administré sous forme d'extrait (Athanasiadou et al, 2000a et 2001a; Paolini et al, 2003a; Paolini et al, 2003c; Cenci et al, 2007)
- par l'exploitation du parcours végétatif (Kabasa et al, 2000).

## 7.4. Facteurs de variation de la teneur en tannins

La teneur en tannins d'une plante varie en fonction de plusieurs facteurs intrinsèques, tels l'espèce et la variété, la partie ou le stade végétal, et de facteurs extrinsèques, comme les conditions climatiques, pédologiques ou les stress de prédation (Mueller-Harvey et Mc Allan, 1992; Jean-Blain, 1998; Norton, 1999; Waterman, 1999).

### 7.4.1. L'espèce végétale et la variété

Au sein d'une même famille botanique, les espèces végétales présentent des différences de teneur et de nature des tannins. Pour prendre le seul exemple des légumineuses, la concentration en TCs diffère largement : 0,3g TCs/Kg de la MS dans le trèfle, 30g TCs/Kg MS dans le sainfoin (Koupai-Abyazani et al, 1993; Marais et al, 2000), 35g TCs/Kg MS dans le sulla (Hoskin et al, 2000).

Au sein d'un même genre, il existe aussi des différences entre espèces. Par exemple les teneurs en TCs diffèrent entre le lotier pédonculé (*L.pedunculatus*) (77g TCs/Kg MS) (Foo et al, 1997) et le lotier corniculé (*L.corniculatus*) (48g TCs/Kg MS) (Foo et al, 1996).



Enfin, des variations de concentration en TCs ont été observées entre les diverses variétés d'une même espèce de lotier corniculé (*L.corniculatus*) (Hedqvist et al, 2000) ou de sulla (*Hedysarum coronarium*) (Piluzza et al, 2000).

#### 7.4.2. La partie végétale

Les différents organes de la plante présentent des teneurs en tannins variables. En général, les plus fortes concentrations sont mesurées dans les fruits, les fleurs et les feuilles, et dérisoirement dans les tiges.

Par exemple, il a été mesuré que les feuilles, les fleurs et les tiges de sainfoin contiennent respectivement 0,31%, 0,30% et 0,07% de tannins (Borreani et al, 2003).

#### 7.4.3. Le stade végétal

Pour une espèce donnée, le stade végétatif influence également la teneur en tannins (Jean-Blain, 1998). Généralement, lors de la croissance de l'appareil végétatif, il y a une dilution des tannins. Dans les feuilles, la quantité et la qualité des tannins changent lors de la maturation. De même, la teneur en tannins diminue généralement lors du mûrissement des fruits.

Par exemple, la maturation des feuilles de chêne entre avril et septembre est accompagnée par des modifications de la teneur et une augmentation du degré de polymérisation des tannins (Makkar et al, 1991). Un processus similaire a été observé chez les légumineuses. Ainsi, la teneur en TCs du sainfoin varie de 27 à 16g/Kg de la MS pendant la phase de croissance (Borreani et al, 2003).

La qualité des TCs varie aussi en fonction du stade végétatif (Koupai-Abyazani et al, 1993; Marais et al, 2000). Lors de la maturation des feuilles de sainfoin, des variations du degré de polymérisation (de 5 à 8,5) et du pourcentage de prodelphinidols (de 60 à 95%) ont été observées (Koupai-Abyazani et al, 1993).

#### 7.4.4. Les conditions environnementales

La synthèse des tannins est généralement augmentée en réponse à un stress environnemental quelque soit son origine, tel qu'un stress hydrique, un appauvrissement du sol ou un ensoleillement trop fort (Bennick, 2002). De plus, la proportion de TCs sous forme libre ou liée aux fibres ou aux protéines est également sous l'influence des conditions climatiques et du stress nutritif (Frutos et al, 2002).

Ainsi, après une longue période de sécheresse, Feucht et al, (1997) ont observé une augmentation de 7,4 fois de la teneur en flavan-3-ols dans des feuilles jaunissantes d'être par rapport aux feuilles vertes. Récemment, une étude sur les grains de raisin (*Vitis vinifera* L.) a



aussi montré que la teneur en flavan-3-ols et la distribution des TCs dans les tissus dépendaient de l'exposition à la lumière et des conditions climatiques (Cadot et al, 2006). La nature du sol affecterait aussi la qualité des TCs puisque les grains de raisins cultivés sur un sol sableux avec peu de réserve en eau ont présenté une proportion de PDs plus faible que ceux cultivés sur un sol plus riche (Cadot et al, 2006).

Enfin, un stress engendré par l'agression des végétaux par des herbivores ou des pathogènes induit une synthèse accrue de métabolites secondaires et un stockage important de tannins, en particulier des TCs, au niveau de la zone attaquée (Woodward et Coppock, 1995; Feucht et al, 1997).

Figure 7 : Quelques plantes légumineuses riches en tannins



**Sainfoin** (*Onobrychis viciifoliae*)



**Sulla** (*Hedysarum coronarium*)



*Lespedeza cuneata*



**Lotier pédonculé** (*Lotus pedunculatus*)



**Lotier corniculé** (*Lotus corniculatus*)

## **ETUDES PERSONNELLES**

## OBJECTIFS

Chez les petits ruminants, les études menées jusqu'à présent, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, ont confirmé un effet des plantes riches en métabolites secondaires, notamment en tannins condensés sur le parasitisme gastro-intestinal par les nématodes. Cependant, une forte variabilité dans les résultats a été observée en fonction de la source de tanins, de l'hôte et des espèces parasites.

**L'objectif général de ce travail de thèse** était de comparer le rôle de divers facteurs liés à la ressource exploitée dans la variation des effets AHs observés et de profiter de cette variabilité d'activité pour analyser et préciser le rôle joué par divers métabolites secondaires dans les propriétés antiparasitaires constatées.

Pour réduire au maximum les autres sources potentielles de variation, nos travaux ont été réalisés en prenant le sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) comme modèle principal de légumineuses fourragères contenant des TCs. Ils ont porté sur la même souche d'*Haemonchus contortus*, nématode de l'abomasum des petits ruminants, comme modèle parasite.

**Le premier objectif** de notre travail a été de comparer, à partir de résultats d'études *in vitro* et *in vivo*, la variabilité d'effets anthelminthiques mesurés entre espèces de plantes contenant des tannins et des polyphénols, appartenant à des familles botaniques variées, et participant à la couverture de parcours méditerranéens.

**Le deuxième objectif** de nos travaux a été d'évaluer la variabilité intraspécifique en examinant l'influence de facteurs liés :

- a) à l'environnement,
- b) aux variétés génétiques ou
- c) aux modes de préservation technologique

sur les propriétés anthelminthiques du sainfoin mesurées en conditions *in vitro*.

Enfin, notre **troisième objectif** a été de déterminer la nature des molécules actives et d'explorer comment la variabilité d'activité observée pourrait être liée à des variations quantitatives ou qualitatives en composés phénoliques présents.

Cette thèse a été préparée sous forme d'articles soit publiés soit prêts à être soumis.

# CHAPITRE 1

## Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes

F. MANOLARAKI<sup>1,2</sup>, S. SOTIRAKI<sup>1</sup>, A. STEFANAKIS<sup>3</sup>, V. SKAMPARDONIS<sup>1</sup>, M. VOLANIS<sup>3</sup> and H. HOSTE<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> NAGREF-VRI NAGREF Campus, Themi 57001 PO Box 60272 Thessaloniki, Greece

<sup>2</sup> UMR 1225 INRA/ENVT. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France

<sup>3</sup> NAGREF-Subtropical Plant and Olive Tree Institute of Chania, Argokepion 73100, Chania Creta, Greece

(Received 20 May 2009; revised 16 July, 2 August and 12 August 2009; accepted 12 August 2009)

### SUMMARY

The anthelmintic properties of tannin-rich plants are being explored as an alternative to chemical drugs. Most data have been acquired on legume forages, but only few on browse plants. The present study aimed to (i) screen the *in vitro* effects of extracts from 7 Mediterranean plants on *Haemonchus contortus*, (ii) verify the role of tannins using an inhibitor, polyvinyl pyrrolidone (PVPP) and (iii) verify the *in vivo* effects of extracts from 4 plants. Significant inhibition was shown *in vitro* using a larval migration inhibition (LMI) assay for all extracts except that from *Olea europaea* var. *koroneiki*. After adding PVPP, the LMI values were restored to control levels for all plants except *Pistacia lentiscus* and *Ceratonia siliqua*, confirming a role for tannins in the activity. In the *in vivo* experiment, 48 lambs composed 6 groups, depending on diet. On Day 0, groups G1–G5 received *H. contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* larvae and G6 remained uninfected. The various diets were distributed from Days 14 to 45: *P. lentiscus* (G1), *Quercus coccifera* (G2), *C. siliqua* (G3), *Onobrychis vicifolia* (G4), or *Medicago sativa* for the 2 control groups (G5, G6). Egg excretion, packed cell volumes (PCVs) and inorganic phosphate were measured weekly throughout the entire experimental period. At slaughter, the worms were enumerated and their fecundity assessed. Consumption of the 4 browse plants did not provoke differences in pathophysiological measurements but there were significant decreases in egg excretion, mainly explained by significant decreases in worm fecundity for both species, without any statistical difference in worm numbers.

Key words: nematodes, tannins, browse plants, natural anthelmintic, sheep.

### INTRODUCTION

Gastrointestinal nematodes are a major problem in grazing ruminants throughout the world, because of the production losses that they cause (Sykes, 1994). In the past decades, the control of these parasites has essentially relied on the repeated use of chemical anthelmintics. However, the worldwide diffusion of anthelmintic resistance within worm populations (Jackson and Coop, 2000; Kaplan, 2004) and the increasing concern of consumers about drug residues in food have stimulated the search for alternative solutions (Waller, 1999). These alternatives include bioactive plants, which are rich in secondary metabolites and seem to represent a promising option to reduce the intensity of nematode infections in small ruminants.

To date, most studies on bioactive plants have been dedicated to temperate, tannin-rich legume

forages (family Fabaceae), such as sulla (*Hedysarum coronarium*), big trefoil (*Lotus pedunculatus*), birdfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), *sericea lespedeza* (*Lepedeza cuneata*) or sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) (Min and Hart, 2003; Hoste *et al.* 2006; Shaik *et al.* 2006). The consumption by small ruminants of these tannin-rich forages has usually been associated with a modulation of nematode biology and with improved host resilience (Hoste *et al.* 2005). For most of these forages, anthelmintic activity has been related to a role of condensed tannins (Molan *et al.* 2000, 2003; Barrau *et al.* 2005; Brunet and Hoste, 2006; Brunet *et al.* 2008). Nevertheless, in many small ruminant production systems, cultivated forages do not characterize the main feed sources, whereas browse plants (bushes, trees, or shrubs) provide significant nutrition, enabling small ruminants to survive on rangelands during a prolonged dry period, such as in Mediterranean climes. These browse plants provide green forage for grazing animals throughout the year (Papachristou *et al.* 2005), and many of them, although belonging to different botanical families, are rich in tannins (Frutos *et al.* 2002). However, the possible anthelmintic activity of those plants

\* Corresponding author: UMR 1225 INRA/ENVT. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cedex, France. Tel: +33 5 61 19 38 75. Fax: +33 5 61 19 32 43. E-mail: h.hoste@envt.fr



composing the vegetation of rangelands has received little attention.

Initial *in vitro*-screening performed on some bushes or trees from the Southern part of France, which represent the feed of goats, indicated anthelmintic properties for 6 species, including *Quercus robur*, *Rubus fruticosus*, *Corylus avellana*, *Castanea sativa*, *Pinus sylvestris* and *Erica erigena* (see Paolini *et al.* 2004; Bahuaud *et al.* 2006). Some recent *in vivo*-field studies have also emphasized some anti-parasitic effects associated with the consumption of heather (*Calluna vulgaris*) by naturally infected Cashmere goats (Osoro *et al.* 2007a,b). Moreover, it has been shown that the positive effects of heather consumption on nematode populations were not associated with any anti-nutritional effects (Frutos *et al.* 2008).

In the current study, we investigated the possible anthelmintic properties of some common, widely distributed Mediterranean plants. The 7 plants examined were selected because of (a) their large distribution around the Mediterranean basin, (b) their common exploitation by sheep and goats, (c) their large tannin content according to the literature, and (d) their possible use of waste products as feed supplements for 2 species (*C. siliqua* and *O. europaea* leaves). The objectives were (i) the *in vitro* screening of 8 plant extracts for anthelmintic properties against *Haemonchus contortus*, (ii) the evaluation of the role of tannins in relation to the observed effects by measuring the tannin content in the different plants and employing an inhibitor, and (iii) the confirmation of an *in vivo* anthelmintic activity for 4 of the plants.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Plants and preparation

All plants used originated from Creta Island, except the samples from chestnut trees which were collected from the Pelion Mountain on the mainland of Greece. The plant samples were collected from the field in autumn 2007. In total, 8 samples from 7 different plants were collected: leaves from (a) evergreen pistache (*Pistacia lentiscus*), (b) wild pear tree (*Pyrus spinosa*), (c) kermes oak tree (*Quercus coccofera*), (d) carob (*Ceratonia siliqua*), (e) olive (*Olea europaea* var. *koroneiki*) and fruit from (f) chestnut tree (*Castanea sativa*) and (g) carob (*Ceratonia siliqua*). Moreover, a tannin-rich plant, sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), known for its anthelmintic activity (Paolini *et al.* 2003, 2005), was collected from locally cultivated forages as a control.

After oven drying (50 °C for 4 days), 5 g of each plant sample were ground (to 1 mm in size) and then extracted by shaking in an acetone:water (70:30) solution for 1 h at <50 °C. The filtrate was concentrated under low pressure at 40 °C and then washed

3 times in 50 ml of dichloromethane to remove chlorophyll and lipids. Following freeze-drying for 24 h, a powder of plant extract was eventually obtained and subsequently kept at 4 °C until use.

##### In vitro assay

The larval migration inhibition (LMI) bioassay, modified by Rabel *et al.* (1994), was used to determine the potential inhibitory effects of the 8 extracts (at different concentrations) on 5 to 6-month-old ensheathed third-stage larvae (L3s) of *H. contortus*. The L3s were produced from eggs from the faeces from a donor sheep monospecifically infected with *H. contortus* (MAFF, 1986) and stored at 4 °C.

For each plant extract, 3 ml containing 3000 L3s were added to plastic tubes containing a similar volume of either phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M phosphate, 0.05 M NaCl, pH 7.2), as a negative control, or with a range of concentrations of individual plant extracts diluted with PBS. Four concentrations (150, 300, 600 or 1200 µg of extract/ml) were tested per assay. All incubations were carried out at 20 °C for 3 h. Thereafter, the L3s were washed (3 times using 3 ml of PBS), and centrifuged (at 2500 g for 5 min). After the last wash, 800 µl aliquots of the L3 suspension were transferred to inserts equipped with a 20 µm mesh, positioned in a conical tube located just above PBS. This mesh was selected to ensure that the migration of L3s through the pores reflected an active process. Three replicates were included for each plant concentration as well as for the negative control. After 3 h at 20 °C, the inserts were removed. The numbers of L3 that had migrated through the mesh were counted under a stereomicroscope at a 40-times magnification. The percentage of migration was calculated as  $M/T \times 100$ , where M was the number of L3 present in PBS and T the total number of L3 originally deposited in the insert. When necessary, the percentage of inhibition was calculated as  $(T - M/T) \times 100$ .

In order to ascertain the role of tannins in the *in vitro* effects on *H. contortus* L3, an additional assay was performed using PVPP (Sigma Aldrich Ltd) on the 7 samples which had shown potential anthelmintic activity in the previous LMI assay. *O. europaea* was not included because it lacked a significant effect. Extract samples (using a concentration of 1200 µg/ml PBS) were incubated overnight at 4 °C with or without addition of PVPP (50 mg/ml of PBS). PVPP was used because of its property to bind tannins and flavonoids and, consequently, its ability to deplete the samples of tannins (Doner *et al.* 1993). After this first step, the samples were vortexed and then centrifuged (2500 g for 10 min). The supernatant was collected for subsequent use in an LMI assay, as described previously. PBS was used as negative control. Four replicates were run per plant

extract, plant extract plus PVPP as well as the PBS control.

#### In vivo assay

The anthelmintic activity of 4 selected plants was tested in lambs experimentally infected with gastrointestinal nematodes. Forty-eight, 3-month-old lambs were allocated to 6 groups of 8 animals each. Lambs were kept indoors, each group being in a separate room. Lambs in groups 1 to 4 were fed with *P. lentiscus*, *Q. coccifera*, *C. siliqua* (flour made from fruits, incorporated into supplement) and *O. vicifolia* hay, respectively. The lambs in groups 5 and 6 comprised a (positive) infected and a (negative) uninfected control group, respectively, receiving lucerne (*Medicago sativa*) hay.

The sheep raised under helminth-free conditions were drenched with albendazole at the recommended dose rate of 15 mg/kg before the start of the experiment. On day-14, two weeks prior the experimental infection with nematodes, each group of lambs received the specialized diet *ad libitum*. During the whole period of the study (i.e. 60 days), all groups received a fattening (total mixed) ration, which was isoenergetic and isoproteic and also balanced for crude fibre, Ca, P and Ca : P ratio. For *P. lentiscus*, *Q. coccifera* and *O. vicifolia* hay, the quantity of tannins consumed per day was calculated to represent 0.1% of the metabolic body weight (BW) for the whole period of the experiment. For *C. siliqua*, this value was estimated to represent only 0.05% of the metabolic BW.

On day 0, individual lambs in groups 1 to 5 were infected with a single dose of 7000 *H. contortus* and 5000 *T. colubriformis* L3s. The L3s had been cultured from the faeces of monospecifically infected donor lambs and had been stored under optimal conditions for 1–2 months. The lambs in group 6 remained uninfected. After having been kept indoors under helminth-free conditions, the lambs were euthanized at the end of the 45-day experimental period.

The bodyweights of individual animals were recorded monthly, at the beginning (Day-14), one month (Day 14) and two months (Day 45) in order to estimate the body weight gain (BWG) rate. The refusal rates per group for the consumption of the 4 plants were measured daily during the entire experimental period. Individual faecal samples were taken weekly, from Day 0 to Day 45, to determine the faecal egg counts (FECs), expressed as trichostrongylid eggs per gramme (EPG), according to a modified McMaster technique (Raynaud, 1970). In addition, during the experimental period (Day 0 to Day 45), blood samples were collected weekly employing tubes with and without heparin to measure the Packed Cell Volume (PCV) using a microhaematocrit method and the inorganic phosphate

values using a photometric assay (Robinson *et al.* 1971).

At necropsy, the abomasa and the first 12 meters of small intestine were removed. The worms were collected from both the luminal contents and the digesta of either the abomasal or intestinal mucosa after a 4-h incubation in a pepsin solution at 37 °C. Worm counts were performed according to a 10% aliquot technique (MAFF, 1986). Morphological identification of worm stages, sex and species were conducted using a standard approach (MAFF, 1986).

The fertility of female worms was measured using 10 worms per lamb. For *T. colubriformis*, eggs *in utero* were counted after clearing in 85% lactic acid. For *H. contortus*, the fertility was determined using the method described by Kloosterman *et al.* (1978). The worms were soaked for 5 min in a large volume of distilled water, before being placed individually in microtubes with 1000 µl of 0.125% hypochloride solution. After 20 min at room temperature (22–24 °C), female worms disintegrated in this solution, enabling the direct counting of eggs under a stereomicroscope using an aliquot (10%) of the total volume. All egg counts were performed under a microscope at a 10-times magnification.

#### Evaluation of tannin content

The contents of total phenols, total tannins and condensed tannins as well as the biological activity for the 8 plant samples as well as that of *M. sativa*, used as the control plant in the *in vivo* experiment, were estimated through different measurements.

The biological activity of the plant samples, related to the tannin content was measured using the Radial Diffusion Method (Hagerman and Butler, 1978), which is based on the property of tannins to form complexes with proteins. We used bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich Ltd) as protein source and tannic acid (Sigma Ltd) as a standard. The results were expressed in g-equivalents of tannic acid/100 g of dry plant (DP).

The Folin Ciocalteu method (Makkar, 2003) was used to determine the total polyphenols (TPs) and total tannins (TTs) in the extracts. After the initial measurements of TPs, PVPP (Sigma Aldrich Ltd) was added to the extract then TTs was calculated as the difference between TPs measured with or without addition of PVPP in the same extract. The TPs and TTs were determined by recording the absorbance at 725 nm using a spectrophotometer (UV-Visible Spectronic Unicam, Genesys 8). A tannic acid standard curve was performed and the results were expressed as tannic acid equivalents.

The butanol HCl method (Makkar, 2003) was used to estimate the condensed tannins (CTs) present in the various extracts. The results were measured at an absorbance of 550 nm in a spectrophotometer



Table 1. Mean measurements ( $\pm$  s.d.) of total phenols, total tannins, condensed tannins and biological activity for 8 samples of Mediterranean plants and *Medicago sativa*

	Total phenols <sup>1</sup>	Total tannins <sup>2</sup>	Condensed tannins <sup>3</sup>	Biological activity <sup>4</sup>
<i>Q. coccifera</i> (leaves)	13.36 ( $\pm$ 1.33)	7.84 ( $\pm$ 0.01)	1.12 ( $\pm$ 0.23)	8.98 ( $\pm$ 0.27)
<i>C. siliqua</i> (leaves)	18.38 ( $\pm$ 5.10)	11.57 ( $\pm$ 0.52)	2.86 ( $\pm$ 1.31)	6.54 ( $\pm$ 0.33)
<i>P. lentiscus</i> (leaves)	17.84 ( $\pm$ 4.72)	10.92 ( $\pm$ 1.10)	4.66 ( $\pm$ 0.90)	2.44 ( $\pm$ 0.08)
<i>C. sativa</i> (fruit)	2.17 ( $\pm$ 0.24)	1.12 ( $\pm$ 0.09)	0.98 ( $\pm$ 0.17)	2.35 ( $\pm$ 0.16)
<i>O. viciifolia</i> (leaves)	2.37 ( $\pm$ 0.34)	0.95 ( $\pm$ 0.33)	1.58 ( $\pm$ 0.41)	1.50 ( $\pm$ 0.05)
<i>C. siliqua</i> (fruit)	2.33 ( $\pm$ 0.24)	1.26 ( $\pm$ 0.09)	0.42 ( $\pm$ 0.07)	1.44 ( $\pm$ 0.09)
<i>P. spinosa</i> (leaves)	2.40 ( $\pm$ 0.40)	0.71 ( $\pm$ 0.08)	0.84 ( $\pm$ 0.12)	0.99 ( $\pm$ 0.01)
<i>O. europaea</i> var. <i>koroneiki</i> (leaves)	2.12 ( $\pm$ 0.21)	0.86 ( $\pm$ 0.10)	0.08 ( $\pm$ 0.05)	1.40 ( $\pm$ 0.07)
<i>M. sativa</i>	1.45 ( $\pm$ 0.33)	0.51 ( $\pm$ 0.09)	0.03 ( $\pm$ 0.01)	1.16 ( $\pm$ 0.01)

<sup>1,2</sup> TPs, TTs: expressed as g-equivalent tannic acid/100 g DP.

<sup>3</sup> CTs: expressed as g-equivalent leucocyanidin/100 g DP.

<sup>4</sup> BA: expressed as g-equivalent tannic acid/100 g of dry plant (DP).

(UV-Visible Spectronic Unicam, Genesys 8). Results were expressed as leucocyanidin equivalents.

#### Statistical analyses

Significant differences in the LMI values linked to different experimental groups and concentrations were assessed using a general linear model (GLM) procedure with the Systat 9 software (SPSS Ltd, 1999). For the PVPP-based assay, the differences in results between the PBS control, the extract and the extract plus PVPP were analysed using a non-parametric Kruskal-Wallis test. A multiple correspondence analysis (MCA) was also performed using the Systat 9 software (SPSS Ltd) to obtain a synthetic description of the relationships between the effects on larval migration and the main biochemical characteristics associated with polyphenols and tannins in the various plants. The 5 variables composing the column of the matrix used for the MCA were categorical. They included the value of inhibition of migration, the total phenol, total tannin and condensed tannin measurements as well as the value of biological activity. The 8 rows (individual data) of the matrix corresponded to the 8 different plants assayed on *H. contortus*.

FEC data were  $\log_{10}(x+1)$  transformed prior to analysis. For the egg excretion, the PCV and the inorganic phosphate values, comparisons were first performed using an analysis of variance on repeated measurements. In addition, comparison of results to the control values was conducted date by date on a one-way analysis of variance (ANOVA) employing the *post-hoc* Bonferroni test. The same statistical test was also used to compare the differences in the monthly and overall bodyweight gains. The mean number of each nematode species as well as the total number of worms recovered at necropsy were compared to the control values using the non-parametric Kruskal-Wallis test. A similar test was employed to

examine the differences in fertility of female worms (both *H. contortus* and *T. colubriformis*) between the experimental and control groups.

#### RESULTS

##### Tannin and phenol measurements

By comparison to *M. sativa*, the tannin-free plant, the plants tested could be separated into 2 groups, characterized either by high or low TP and TT contents (Table 1). The first group included *Q. coccifera*, *C. siliqua* (leaves) and *P. lentiscus*; the second group comprised *C. sativa*, *O. viciifolia*, *C. siliqua* (fruit), *O. europaea* and *P. spinosa*. Overall, the high or low TP and TT of plants coincided with high or low CTs content, respectively, with the exception of *O. viciifolia* (Table 1).

The plant extracts that showed high protein-binding activity were *Q. coccifera*, *C. siliqua* (leaves). Extracts of *P. lentiscus*, *C. sativa*, *O. viciifolia*, *C. siliqua* (fruit) and *O. europaea* revealed moderate activity. In contrast, the *P. spinosa* extract showed the lowest biological activity. The extract of *M. sativa* was used as a tannin-free control (Table 1).

##### Anthelmintic activity in vitro

For the negative control (PBS), the mean percentage of migration for *H. contortus* in the different LMI assays was 93% ( $\pm$  12.9). Overall, most of the plant extracts tested reduced significantly L3 migration. A significant dose-dependent anti-parasitic effect was established for *Q. coccifera* ( $P < 0.001$ ), *C. siliqua* fruit ( $P < 0.001$ ), *C. siliqua* leaves ( $P < 0.001$ ), for *C. sativa* ( $P < 0.001$ ) and for *P. spinosa* ( $P = 0.013$ ) (Fig. 1). Significant effects were also determined for *P. lentiscus* ( $P < 0.001$ ) and *O. viciifolia* ( $P < 0.001$ ). However, for the latter 2 plants, the statistical analysis did not indicate a dose-dependent effect. In

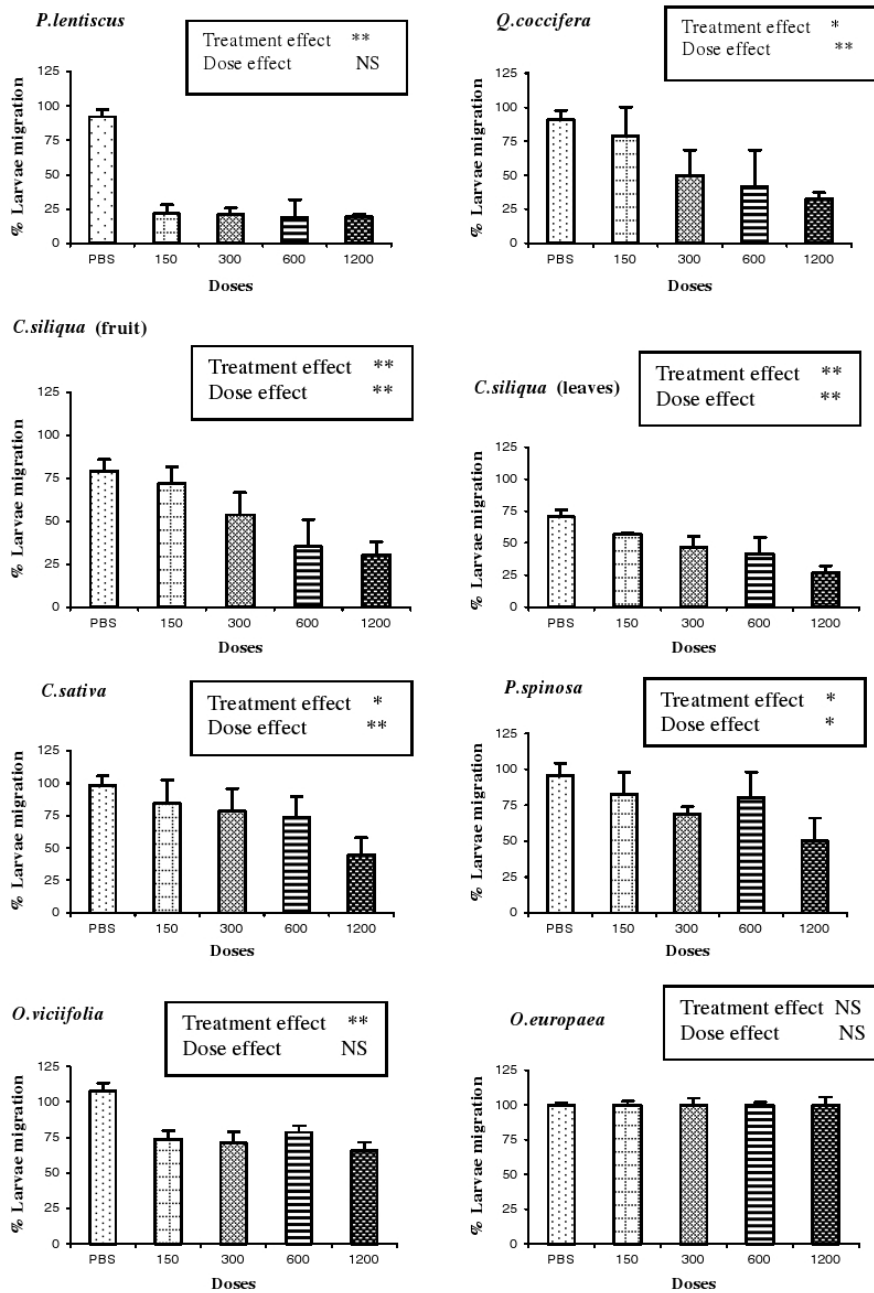


Fig. 1. Effects of Mediterranean plant extracts at concentrations of 150, 300, 600, 1200 µg/ml on the migration of infective larvae of *Haemonchus contortus*. Results are shown as means (± S.D.) of triplicates. PBS was used as a negative control. Results of statistical comparisons according to the 2 factors: plant extract or dose effect are indicated by (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; NS, non-significant).

contrast, when compared with the PBS control values, no difference was found for the migration of L3s after contact with *O. europaea* extracts.

At the highest concentration of 1200 µg of extract/ml, the inhibitory effects on *H. contortus* L3 migration compared with the PBS control values, were

79.1%, for *P. lenticus*, 63.8%, for *Q. coccifera*, 61.5% and 61.4% for *C. siliqua* fruit and leaves, respectively, 54.6% for *C. sativa*, 47.4% for *P. spinosa* and 38.9% for *O. viciifolia*.

In the second *in vitro* experiment significant differences in L3 migration were shown following

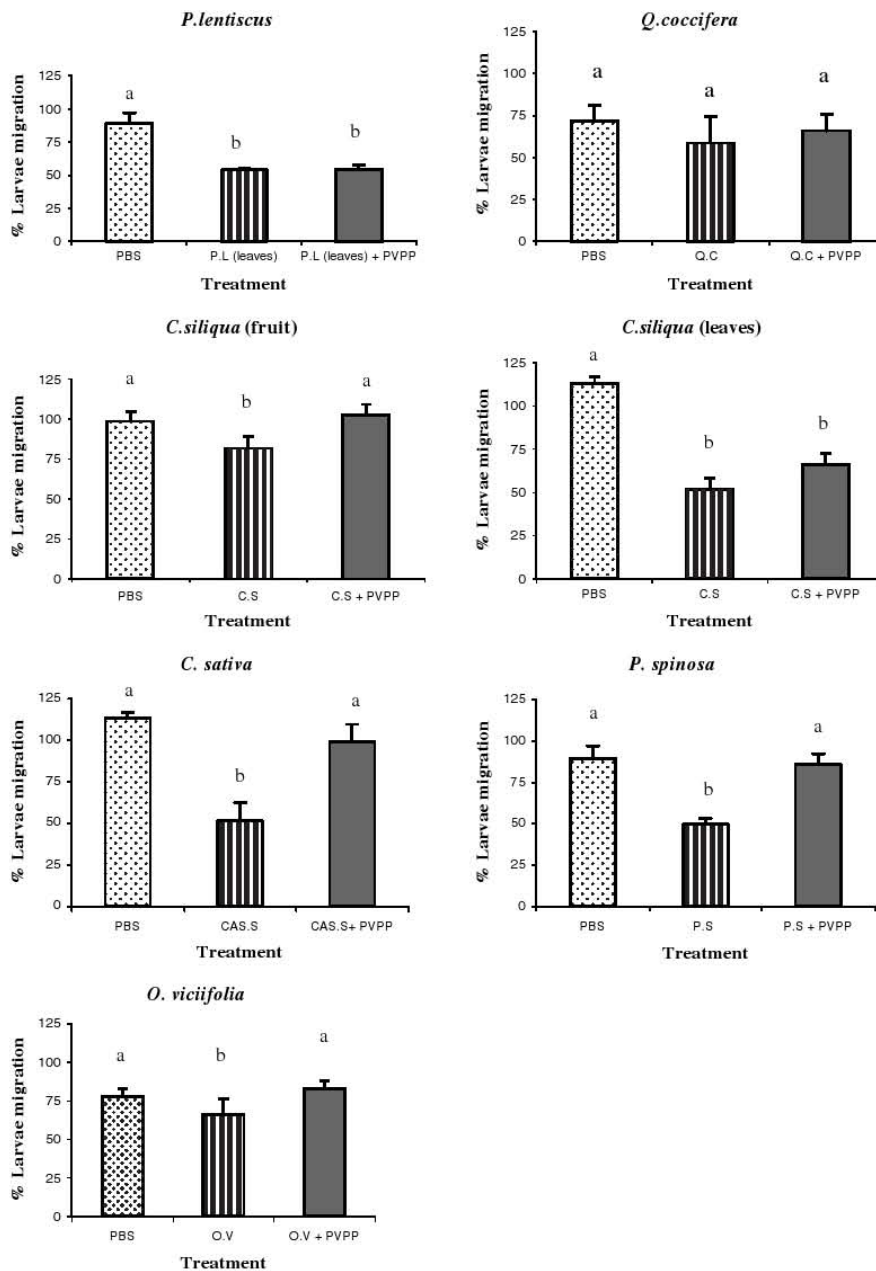


Fig. 2. Effects of Mediterranean plant extracts at 1200 µg/ml, with or without PVPP addition, on the migration of infective larvae of *Haemonchus contortus*. Results are shown as means ( $\pm$  S.D.) of triplicates. PBS was used as a negative control. Different superscripts indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments.

contact with 1200 µg/ml of *P. lentiscus* ( $P < 0.001$ ), *C. siliqua* fruit ( $P = 0.02$ ), *C. siliqua* leaves ( $P < 0.001$ ), *C. sativa* ( $P < 0.001$ ), *P. spinosa* ( $P < 0.001$ ) and *O. viciifolia* ( $P = 0.03$ ) but not for *Q. coccifera* ( $P = 0.313$ ). The addition of PVPP restored values of L3 migration close to control values, which did not differ significantly from those for PBS for *C. siliqua* (fruit), *C. sativa*, *P. spinosa*, *O. viciifolia*. In contrast, for *P. lentiscus* and *C. siliqua* (leaves), the values for

L3 migration remained significantly different from the PBS control even after the addition of PVPP (Fig. 2).

The results of the multivariate analysis are displayed in Fig. 3, with Axis 1 and 2 representing nearly 90% of the total variance. As expected, a close relationship was found between TTs and TPs values. Also a close relationship was found between the CTs and the values for the inhibition of L3 migration,

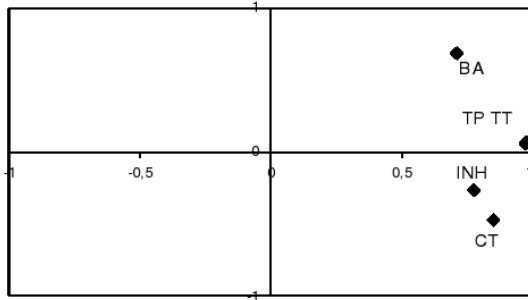


Fig. 3. Principal plane of interactions obtained from the MCA analysis applied on a matrix of 5 columns (variables) describing the tannin and phenol contents of the plants as well as their biological and anthelmintic activities and 8 rows corresponding to the different extracts. INH, inhibition of migration; TT, total tannins; TP, total phenols; BA, biological activity; CT, condensed tannins.

whereas this last variable appeared less related to the biological activity.

#### Testing in vivo

The consumption of the 5 plants offered (*P. lentiscus*, *Q. coccifera*, *C. siliqua*, *O. viciifolia* and *M. sativa*) was high during the entire experimental period for all groups of lambs. No refusal (<5%) of intakes was observed, irrespective of the plant tested. During the experimental period, 1 lamb died in the *Q. coccifera*, *C. siliqua*, *O. viciifolia* and the positive control groups, both because of haemonchosis (in the control or *Q. coccifera* groups) and 2 died due to heat stress.

In the first month of the experiment, no statistical difference in growth was found between the 6 experimental groups (Table 2). In contrast, in the second month, a statistical difference ( $P < 0.01$ ) was determined among the groups. All of the infected groups differed from the uninfected control, except the *C. siliqua* group. As a consequence, when considering the overall, cumulative BWG for the experimental period of 2 months, a statistical difference ( $P < 0.01$ ) was demonstrated between the 5 infected groups when compared with the negative control, but no differences were found among the various experimentally infected groups.

The analysis of variance on repeated measurements revealed statistical differences in the PCV values for all the infected groups compared with the negative control, whatever the diet. In contrast, the comparison between the different infected groups did not indicate any statistical differences in PCV (data not shown). In contrast, for the inorganic phosphate values, the difference found using the analysis of variance of repeated measurements was not significant, albeit close, to significance ( $P < 0.08$ ) (data not shown).

Table 2. Mean values of bodyweight gain on the 1st and 2nd month of the start of the experiment in the groups of lambs receiving the different plants

(Statistical differences from uninfected control values: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .)

Group	BWG <sub>1</sub> (kg) 1st month after the start of the experiment	BWG <sub>2</sub> (kg) 2nd month after the start of the experiment
<i>P. lentiscus</i>	2.81 (±0.26)	1.07 (±0.53)*
<i>Q. coccifera</i>	2.94 (±0.62)	0.93 (±1.62)**
<i>C. siliqua</i>	2.50 (±0.46)	1.57 (±0.67)
<i>O. viciifolia</i>	2.94 (±0.62)	1.07 (±0.45)*
Control (+)	2.70 (±0.46)	0.57 (±0.93)**
Control (-)	2.75 (±0.60)	3.00 (±0.46)

Overall, for the last 3 weeks of the experiment, the results obtained using the ANOVA for repeated measurements indicated that, when compared with the control values observed in the lambs receiving *M. sativa*, the egg excretion was significantly lower in lambs consuming *P. lentiscus*, *O. viciifolia* or *Q. coccifera* ( $P < 0.01$ ) and for those consuming *C. siliqua* ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4). Reductions in EPG increased between the fourth and sixth week following inoculation with infective L3s. Compared with the control (i.e. *M. sativa*), the reductions ranged from 55.2 to 61.3% for *P. lentiscus*, from 36.5 to 63.9% for *Q. coccifera*, from 33.7 to 55.3% for *C. siliqua* and from 49.0 to 79.9% for *O. viciifolia*. This trend towards an increase in reduction of egg output with time was assessed by the analysis of variance performed date by date. No difference to the control group was found 4 weeks after inoculation; a statistical difference ( $P < 0.05$ ) was only found for the *O. viciifolia* group after 5 weeks. In contrast, statistical reductions in EPGs in the *P. lentiscus*, *Q. coccifera* and *O. viciifolia* groups were assessed at 6 weeks following inoculation.

No statistical difference was observed either in the mean total number of worms between the 5 infected groups at necropsy, or in the total number of *H. contortus* or in the total number of *T. colubriformis* recovered (Table 3), although when compared with the *M. sativa* control group, the number of *T. colubriformis* was substantially lower, e.g. by -28.1%, in the lambs consuming *C. siliqua*, by -41.5% and -40.2% in those consuming *Q. coccifera* and *O. viciifolia*, respectively.

Compared with the control infected group, the number of eggs per female *H. contortus* was reduced significantly in the lambs consuming *P. lentiscus* or *O. viciifolia* ( $P < 0.05$ ). In addition, in the group fed *Q. coccifera*, the difference was almost significant ( $P < 0.06$ ). In contrast, no statistical difference was observed for the *C. siliqua* group. For *T. colubriformis*, the fertility of female worms differed



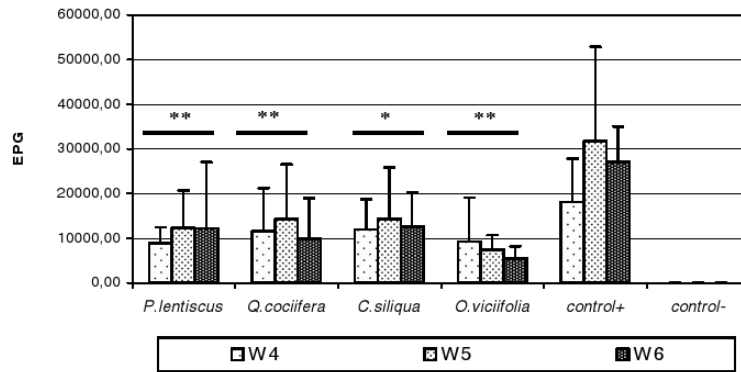


Fig. 4. Comparison of faecal egg counts (arithmetic mean values) on the 4th, 5th and 6th week post-infection, in the groups of lambs fed on browse plants, *O. viciifolia* or *M. sativa*. Results of statistical analysis based on analysis of variance on repeated measurements \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

significantly from the control values for the 4 experimental groups ( $P < 0.05$ ) (Table 3).

#### DISCUSSION

Under Mediterranean conditions, the breeding of small ruminants usually relies on the exploitation of rangelands which are covered with a variety of plants belonging to various botanical families. These plants are usually rich in plant secondary metabolites (PSMs). In the last 10 years, increasing evidence has accumulated to support the hypothesis that anthelmintic properties are associated with some PSMs (Stepek *et al.* 2004; Rochfort *et al.* 2008). In particular, the interest has turned to tannin-rich plants, whose negative effects on gastrointestinal nematodes have been substantiated by consistent experimental results (Hoste *et al.* 2006). However, the majority of studies have focused on temperate legume forages. In contrast, there is a paucity of information on browse plants (Paolini *et al.* 2004; Bahuauud *et al.* 2006), despite their palatability and their significance in covering the nutritional needs of small ruminants, whenever grass availability is low in the Mediterranean areas (Morand-Fehr *et al.* 1983).

Based on the present *in vitro* screening for anthelmintic properties using the LMI assay, all of the plant extracts, except those of *O. europaea*, showed anthelmintic activity, which ranged from 31.1 to 79.1% at the highest concentration. With the exception of *P. lentiscus* and *O. viciifolia*, this anthelmintic activity was dose dependent. To our knowledge, this is the first evidence of anthelmintic activity for *C. siliqua*, *P. lentiscus*, *P. spinosa*. For 3 other plants, the results confirmed previous data obtained either on the same plant with a different *in vitro* assay (*C. sativa*; see Bahuauud *et al.* 2006), or with the same LMI assay on a related plant species (*Q. robur* instead of *Q. coccifera*; Paolini *et al.* 2004). The lack of anthelmintic activity for *Olea europaea var. africana* was demonstrated *in vivo* (Githiori *et al.*

2004). Furthermore, the anthelmintic property of *O. viciifolia* has often been evaluated in different *in vitro* assays (Paolini *et al.* 2004; Barrau *et al.* 2005). Indeed, this tannin-rich fodder was included in the present study as a positive control.

One of the key questions regarding the potential anthelmintic activity linked to natural products is to determine what is (are) the active compound(s). As stated, the different plants tested here were selected because of their large range of tannin contents, including hydrolysable and condensed tannins. Our second objective aimed at testing the proposal that tannins play a major role in the anti-parasitic efficacy measured.

The latter hypothesis was supported by results of the multivariate analysis, which related the various biochemical measurements of the 8 plant samples with the severity of the inhibition of larval migration. The overall conclusions confirm a major role of tannins, particularly condensed tannins. Secondly, the hypothesis was further supported by the results of the experiment performed using PVPP, which is known for its ability to bind and inactivate tannins and polyphenols (Doner *et al.* 1993; Lorimer *et al.* 1996; Makkar, 2003). Therefore, any restoration of values towards control ones following the addition of PVPP to extracts suggests a major role for tannins in anthelmintic activity.

With the exception of *Q. coccifera*, the experimental results were consistent between the two LMI assays. The difference observed for *Quercus* might relate to the lower number of duplicates used to validate the activity in the second assay with PVPP, since only the highest dose was examined. The results obtained for *C. siliqua* fruit, *C. sativa*, *P. spinosa* and *O. viciifolia* indicated that, for those 4 plant extracts, tannins are largely involved. In contrast, for the extracts of *C. siliqua* leaves and *P. lentiscus*, the results were not conclusive, as the addition of PVPP did not fully restore to control values. For both species, a possible explanation could be their

Table 3. Mean number of worms and mean female fecundity ( $\pm$  s.d.) of the two nematode species recovered from the lambs according to the different feeding regimes

(Each lamb was infected with 7000 and 5000 third-stage infective larvae of *H. contortus* and *T. colubriformis* respectively. Results of the statistical analysis by comparison to the control values: \*  $P < 0.05$ ; #  $P < 0.06$ .)

	Worm number			Female fecundity	
	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>	Total worms	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>
<i>P. lentiscus</i>	4083 ( $\pm$ 1330)	1492 ( $\pm$ 1207)	5576 ( $\pm$ 1553)	241.5 ( $\pm$ 69)*	20.8 ( $\pm$ 1.4)*
<i>Q. coccifera</i>	3460 ( $\pm$ 2133)	1002 ( $\pm$ 761)	4462 ( $\pm$ 2216)	227.3 ( $\pm$ 60)#	19.6 ( $\pm$ 1.2)*
<i>C. siliqua</i>	3620 ( $\pm$ 1952)	1230 ( $\pm$ 509)	4850 ( $\pm$ 2283)	307.0 ( $\pm$ 97)	22.0 ( $\pm$ 1.4)*
<i>O. viciifolia</i>	3238 ( $\pm$ 1527)	1025 ( $\pm$ 973)	4264 ( $\pm$ 1674)	254.9 ( $\pm$ 91)*	20.3 ( $\pm$ 2.3)*
Control (+)	3880 ( $\pm$ 1238)	1714 ( $\pm$ 385)	5594 ( $\pm$ 1108)	325.0 ( $\pm$ 72)	25.6 ( $\pm$ 2.1)

high TTs and CTs contents. Therefore, the PVPP quantity used might have been insufficient to inactivate all the tannins in the extracts tested. Another explanation could be the presence of secondary metabolites other than tannins which have potential efficacy against gastrointestinal nematodes. Similar results were shown previously by Barrau *et al.* (2005), who found that in *O. viciifolia*, besides tannins and flavan-3-ols, some flavonol glycosides (e.g. rutin, narcissin and nicotiflorin), also had an effect on gastrointestinal nematodes.

Studies have emphasized the existence of essential oil in the aerial part of *P. lentiscus*, consisting of terpenes as major components (Llusia and Penuelas, 1998; Ahmami *et al.* 2009). In particular, Barazani *et al.* (2003), when analysing the extract obtained from *P. lentiscus* leaves, showed the presence of 12 monoterpenes, 7 sesquiterpenes and 1 linear non-terpenic compound. The potential activity of essential oils of various plant species against *H. contortus* has previously been illustrated. For example, the *in vitro* hatching of *H. contortus* eggs was inhibited efficiently by the essential oil of *Ocimum gratissimum*, in relation to its main component eugenol (Pessoa *et al.* 2002) or by the essential oils of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* and their respective major constituents, anethol and thymol (Camurca-Vasconcelos *et al.* 2007). The anthelmintic effect could be explained by the existence in high quantities of such constituents, which are not bound by PVPP, in the acetone extract of *P. lentiscus*. Further studies are necessary to assess the role of these various components and to establish their mode of action against gastrointestinal nematodes.

Our third objective was to confirm, under *in vivo* conditions, some of the *in vitro* results. Three of the browse plants (*P. lentiscus*, *C. siliqua*, *Q. coccifera*) with the highest anthelmintic activity in the LMI assay were thus compared with a locally grown *O. viciifolia* hay. To our knowledge, this is the first *in vivo* study focusing on the anthelmintic effects of these 3 widespread Mediterranean browse plants, which are commonly consumed by sheep and goats.

Overall, the *in vivo* results confirmed the *in vitro* findings. By comparison with the control group fed on *M. sativa*, the lambs receiving the 3 browse plants or the *O. viciifolia* showed significant decreases in FECs, which seemed to increase with the length of plant consumption, since, in the last week of experiment, some values of reduction reached 80% compared with control levels. Because caution was taken to make the diet in all groups isoenergetic and isoproteic, and because no differences in refusals were observed between the experimental groups, it is suspected that these main differences in the biology of worms were not related to quantitative differences in the diet composition (Coop and Kyriazakis, 1999), but rather to qualitative differences due to the presence of some active PSMs.

Some studies have examined *in vivo* the anthelmintic effects associated with the consumption of *O. viciifolia* in infected sheep (Heckendorn *et al.* 2006, 2007) or goats (Paolini *et al.* 2003, 2005). Although the mode of infection (experimental or natural conditions) and the parasitic species differed, our current results are in agreement with those of these previous studies. Sheep or goats consuming *O. viciifolia* usually presented significant reductions in nematode egg output, which were related either to a decreased worm fertility (Paolini *et al.* 2005) or to a reduced worm number (Heckendorn *et al.* 2006, 2007). In contrast to tannin-rich forages, only a few browse species have been investigated *in vivo* for their potential anthelmintic effects on gastrointestinal nematodes. Osoro *et al.* (2007a, b) tested the effect of *Calluna vulgaris* consumption, a tannin-rich plant that thrives in temperate areas, on naturally infected goats and have shown consistent reductions in nematode egg excretion. Similarly, *Acacia cyanophylla*, a tanniniferous legume shrub, appeared to be able to constrain the parasitic infection due to a significant reduction of FECs in sheep (Akkari *et al.* 2008).

In the different previous studies on tanniniferous forages (Hoste *et al.* 2006), two different parameters (reduction of worm number and/or of worm fertility)

seemed to explain the significant decreases in FECs. However, depending on the plant species, the nematode species and/or the anatomical location, their relative importance varies. In the present study, for *Haemonchus* number, no statistical difference from the control values was found, whatever the experimental diet. The maximum reduction (16.5%) was found for *O. viciifolia*. Although important reductions in the intestinal worm numbers, close to 30–40%, were found in the lambs fed on *C. siliqua*, *Q. coccifera* or *O. viciifolia*, the differences from the control group were again not significant. Differences in the effects of tannin-rich plants between abomasal and intestinal nematodes have been reported previously. For instance, using quebracho as a source of condensed tannins, Athanasiadou *et al.* (2001) found more severe effects on the intestinal genera *Trichostrongylus* and *Nematodirus* than on abomasal parasites, such as *Haemonchus* and *Teladorsagia*. Paolini *et al.* (2005) also recorded a higher susceptibility in intestinal compared with abomasal species in naturally infected goats receiving *O. viciifolia*. However, Heckendorn *et al.* (2006, 2007) found the opposite in lambs infected with *Haemonchus* and *Cooperia*.

In the present study, the significant reductions of FECs were principally associated with significant reductions in worm fertility for both nematode species. The sole exception was for *H. contortus* in lambs fed on *C. siliqua*. After *O. viciifolia* consumption by goats, Paolini *et al.* (2005) also associated the reductions in egg excretion with significant decreases in female worm fertility, for both intestinal and abomasal species. Similarly, Lange *et al.* (2006) related FEC reductions in sheep receiving sericea lespedeza to a decrease in fecundity in *Haemonchus*. In contrast, Heckendorn *et al.* (2006, 2007) related FEC decreases to reduced worm burdens when testing the effect of *O. viciifolia* hay or silage in experimentally infected sheep.

Overall, the present results obtained for 3 browser plant species support their potential use to improve the sheep health and welfare, because of the presence of PSMs. Recent studies (Ben Salem *et al.* 2003, 2007, 2008) have emphasized the interest of such shrub and tree resources in mountainous, arid and semi-arid zones for animal feed either by direct use or by use of agro-industrial by-products. However, the potential negative, anti-nutritive effects of some PSMs was also indicated (Ben Salem *et al.* 2007). Therefore, it is clear that further research is needed to better understand the exact nature of the plant secondary metabolites responsible for the anthelmintic effects and to analyse their mode of action on the nematodes. On the other hand it will be important to estimate the trade-off between the negative and positive consequences of PSMs either on parasitism or on digestive physiology and to develop technologies enabling the controlled distribution of active

compounds to small ruminants to achieve optimal benefits in production.

Mrs Manolaraki is a grateful recipient of a fellowship linked to the EU Marie Curie project entitled 'Healthy Hay' (contract: MRTN-CT-2006-035805). The COST project CAPARA is also acknowledged. Ms S. Brunet is thanked for her assistance.

## REFERENCES

- Ahmamdi, H., Aouinti, F., Wathélet, J. P. and Elbachiri, A.** (2009). Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *Records of Natural Products* **3**, 90–95.
- Akkari, H., Ben Salem, H., Gharbi, M., Abidi, S. and Darghouth, M. A.** (2008). Feeding *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage to Barbarine lambs with or without PEG: Effect on the excretion of gastro-intestinal nematode eggs. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 182–192. doi:10.1016/j.anifeeds.2007.09.017.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F. and 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. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00467-8.
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I. and 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. doi: 10.1017/S0031182005009509.
- Barazani, O., Dudai, N. and Golan-Goldhirsh, A.** (2003). Comparison of Mediterranean *Pistacia lentiscus* genotypes by random amplified polymorphic DNA, chemical, and morphological analyses. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 1939–1952. doi: 10.1023/A:1024862614345.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I. and 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. doi: 10.1017/S0031182005008024.
- Ben Salem, H., Ben Salem, I., Nefzaoui, A. and Ben Said, M. S.** (2003). Effect of PEG and olive cake feed blocks supply on feed intake, digestion, and health of goats given kermes oak (*Quercus coccifera* L.) foliage. *Animal Feed Science and Technology* **110**, 45–59. doi: 10.1016/S0377-8401(03)00215-3.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A. and Makkar, H. P. S.** (2007). Feed supplementation blocks for increased utilization of tanniferous foliages by ruminants. In *Feed Supplementation Blocks. Urea Molasses Multinutrient Blocks: Simple and Effective Feed Supplement Technology for Ruminant Agriculture*. FAO Animal Production and Health Paper (FAO) **164**, 185–105.
- Ben Salem, H., Priolo, A. and Morand-Fehr, P.** (2008). Shrubby vegetation and agro-industrial by-products as alternative feed resources for sheep and goats: Effects on digestion, performance and product quality. *Animal*



- Feed Science and Technology* **147**, 1–2. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.10.001.
- Brunet, S. and 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. doi: 10.1021/jf0610007.
- Brunet, S., Jackson, F. and Hoste, H.** (2008). 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. doi:10.1016/j.ijpara.2007.10.018.
- Camurca-Vasconcelos, A. L., Bevilaqua, C. M., Morais, S. M., Maciel, M. V., Costa, C. T., Macedo, I. T., Oliveira, L. M., Braga, R. R., Silva, R. A. and Vieira, L. S.** (2007). Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology* **148**, 288–294. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.06.012.
- Coop, R. L. and Kyriazakis, I.** (1999). Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology* **84**, 187–204. doi: 10.1016/S0304-4017(99)00070-9.
- Doner, W. L., Becard, G. and Irwin, L. P.** (1993). Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 753–757. doi: 10.1021/jf00029a014.
- Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F. J. and Mantecon, A. R.** (2002). Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology* **95**, 215–226. doi: 10.1016/S0377-8401(01)00323-6.
- Frutos, P., Moreno-Gonzalo, J., Hervás, G., García, U., Ferreira, M. M. L., Celaya, R., Toral, G. P., Ortega-Mora, M. L., Ferre, I. and Osoro, K.** (2008). Is the anthelmintic effect of heather supplementation to grazing goats always accompanied by anti-nutritional effects? *Animal* **2**, 1449–1456. doi:10.1017/S1751731108002681.
- Githiori, B. J., Høglund, J., Waller, J. P. and Baker, L. R.** (2004). Evaluation of anthelmintic properties of some plants used as livestock dewormers against *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Parasitology* **129**, 245–253. doi: 10.1017/S0031182004005566.
- Hagerman, E. A. and Butler, G. L.** (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26**, 809–812. doi: 10.1021/jf60218a027.
- Heckendorn, F., Haring, D. A., Maurer, V., Senn, M. and Hertzberg, H.** (2007). Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology* **146**, 123–134. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.01.009.
- Heckendorn, F., Häring, D. A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W. and Hertzberg, H.** (2006). Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* **142**, 293–300. doi: org/10.1016/j.vetpar.2006.07.014.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M. and Hoskin, S. O.** (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology* **22**, 253–261. doi: 10.1016/j.pt.2006.04.004.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F., Paolini, V., Aguilar-Caballero, A., Etter, E., Lefrileux, Y., Chartier, C. and Broqua, C.** (2005). Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research* **60**, 141–151. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.06.008.
- Jackson, F. and Coop, R. L.** (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* **120**, 95–107. doi: 10.1017/S0031182099005740.
- Kaplan, R. M.** (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* **20**, 477–481. doi: 10.1016/j.pt.2004.08.001.
- Kloosterman, A., Albers, G. A. A. and Van Den Brink, R.** (1978). Genetic variation among calves in resistance to nematode parasites. *Veterinary Parasitology* **4**, 353–368.
- Lange, K. C., Olcott, D. D., Miller, J. E., Mosjidis, J. A., Terrill, T. H., Burke, J. M. and Kearney, M. T.** (2006). Effect of sericea lespedeza (*Lepedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Veterinary Parasitology* **141**, 273–278. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.001.
- Llusia, J. and Penuelas, J.** (1998). Changes in terpene content and emission in potted Mediterranean woody plants under severe drought. *Canadian Journal of Botany* **76**, 1366–1373. doi: 10.1139/cjb-76-8-1366.
- Lorimer, S. D., Perry, N. B., Foster, L. M., Burgess, E. J. B., Douch, P. G. C., Hamilton, M. C., Donaghy, M. J. and McGregor, R. A.** (1996). A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 2842–2845. doi: 10.1021/jf9602176.
- MAFF.** (1986). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- Makkar, H. P.** (2003). Quantification of tannins in tree and shrub foliage, In *A Laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy (FAO/IAEA)*, pp. 49–53.
- Min, B. R. and Hart, S. P.** (2003). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science* **81**, 102–109.
- Molan, A. L., Hoskin, S. O., Barry, T. N. and McNabb, W. C.** (2000). Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Veterinary Record* **147**, 44–48.
- Molan, A. L., Meagher, L. P., Spencer, P. A. and 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. doi: 10.1016/S0020-7519(03)00207-8.
- Morand-Fehr, P., Bourbouze, A., Le Houérou, H. N., Gall, C. and Boyazoglu, G. J.** (1983). The role of goats in the Mediterranean area. *Livestock Production Science* **10**, 569–587. doi: 10.1016/0301-6226(83)90050-7.
- Osoro, K., Benito-Peña, A., Frutos, P., García, P. M., Ortega-Mora, L. M., Celaya, R. and Ferre, I.** (2007a). The effect of heather supplementation on gastrointestinal nematode infections and performance



- in Cashmere and local Celtiberic goats on pasture. *Small Ruminant Research* **67**, 184–191. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.09.032.
- Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Frutos, P., Garcia, U., Ortega-Mora, L. M., Ferreira, L. M., Celaya, R. and Ferre, I.** (2007b). Anthelmintic and nutritional effects of heather supplementation on Cashmere goats grazing perennial ryegrass-white clover pastures. *Journal of Animal Science* **85**, 861–870. doi:10.2527/jas.2006-388.
- Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchie, P. and Hoste, H.** (2005). Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* **127**, 277–283. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.10.015.
- Paolini, V., Dorchie, P. and Hoste, H.** (2003). Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Veterinary Record* **152**, 600–601.
- Paolini, V., Fouraste, I. and Hoste, 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. doi: 10.1017/S0031182004005268.
- Papachristou, T. G., Platis, P. D. and Nastis, A. S.** (2005). Foraging behaviour of cattle and goats in oak forest stands of varying coppicing age in Northern Greece. *Small Ruminant Research* **59**, 181–189. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.05.006.
- Pessoa, L. M., Morais, S. M., Bevilaqua, C. M. L. and Luciano, J. H. S.** (2002). Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* **109**, 59–63. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00253-4.
- Rabel, B., McGregor, R. and Douch, P. G. C.** (1994). Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International Journal for Parasitology* **24**, 671–676. doi: 10.1016/0020-7519(94)90119-8.
- Raynaud, J. P.** (1970). Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie* **45**, 321–342.
- Robinson, R., Roughan, M. and Wagstaff, D. F.** (1971). Measuring inorganic phosphate without using a reducing agent. *Annals of Clinical Biochemistry* **8**, 168–170.
- Rochfort, S., Parker, A. J. and Dunshea, F. R.** (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* **69**, 299–322. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.08.017.
- Shaik, S. A., Terrill, T. H., Miller, J. E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R. M., Burke, J. M. and Mosjidis, J. A.** (2006). *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology* **139**, 150–157. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.02.020.
- Steppek, G., Behnke, J. M., Buttle, D. J. and Duce, I. R.** (2004). Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends in Parasitology* **20**, 322–327. doi: 10.1016/j.pt.2004.05.003.
- Sykes, A. R.** (1994). Parasitism and production in farm animals. *Animal Production* **59**, 155–172.
- Waller, P. J.** (1999). International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology* **29**, 155–164. doi: 10.1016/S0020-7519(98)00178-7.

## CHAPITRE 2

## Variability of the *in vitro* AH activity of sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) related to environmental factors

### Introduction

Parasitic nematodes are of major economic importance in livestock because of the major production losses that they cause throughout the world. Over the past decades, the control of these parasitic diseases has mainly relied on the repeated use of anthelmintic (AH) drugs. However the efficiency of this mode of control is nowadays facing some limits among which the most important is the development and spread of AH resistance within worm populations (Kaplan, 2004; Wolstenholme et al, 2004). Consequently, it is necessary to search out alternative solutions in order to replace or to complement the use of these chemical drugs in order to achieve a more sustainable control of parasitism (Waller and Thamsborg, 2004; Waller 2006).

One of these alternatives is represented by the exploitation of bioactive plants containing secondary metabolites, like alkaloids, terpenoids and phenolics which include flavonoids and tannins. In particular, antiparasitic effects have been associated with various tannin-rich (TR) plants, which can be used as nutraceuticals. Since now, most studies on these TR nutraceuticals have focused on legume forages such as sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) (Shaik 2004; 2006), sulla (*Hedysarum coronarium*) (Niezen et al, 2002; Athanasiadou et al, 2005), birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) (Heckendorn et al, 2007) or big trefoil (*L.pedunculatus*) (Tzamaloukas et al, 2005) and sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) (Paolini et al, 2004, 2005a; Heckendorn et al, 2006, 2007). These plants could act through direct antiparasitic activity by decreasing either the establishment of incoming third stage larvae (L3) in the host (Tzamaloukas et al, 2005; Brunet et al, 2007) or the egg excretion because of the reduced worm numbers (Niezen et al, 2002; Thamsborg et al, 2003; Tzamaloukas et al, 2005; Heckendorn et al, 2006, 2007) or the decreased fertility of female worms (Paolini et al, 2003, 2005a; Heckendorn et al, 2006). *In vitro* studies have also shown that the egg hatching capacity and the development of larvae might negatively be affected by the consumption of TR plants and the presence of active compounds in the faeces (Molan et al, 2002). However variations in results have been observed. For example with sainfoin *in vivo* positive results have been found in sheep (Heckendorn et al, 2007, 2006) or in goats (Paolini et al, 2005, 2003). This was mainly associated with the decrease of egg output, either with hay in goats (Paolini et al, 2003; 2005) or in sheep (Heckendorn et al, 2007, 2006) or with sainfoin silage in experimentally infected lambs (Heckendorn et al, 2006). The changes in egg output have been associated with significant decreases either in worm fecundity (Paolini et al, 2005a) or in worm numbers (Heckendorn et al, 2006, 2007).

However, results of other *in vivo* studies with the same plant did not show any significant AH effect either in sheep or in goats. Athanasiadou et al, (2005) when evaluating the direct effect of sainfoin on *T.colubriformis* did not find any significant effect on the larvae installation, the egg excretion or the worm population. Similarly Paolini et al, (2005b), have noticed no significant differences in the worm population of *H.contortus* in goats, after the sainfoin distribution.

This variability in the antiparasitic effects has been reported to depend on factors related to the parasites (species or stage) or the host (Min and Hart 2003, Hoste et al, 2006). However, the plant related to the content and nature of plant secondary metabolites (PSMs) is probably one of the main sources of the variation. Based on the bibliography the quantity and the nature of tannins as well as other PSMs, depends not only on the plant species, the variety (cultivar), the stage of development but also on the environmental conditions of culture (soil, season, climate, mode of culture) and the mode of conservation (Marais et al, 2000; Mueller-Harvey, 2006; Heckendorn et al, 2006; Haring PhD Thesis, 2007). In order to understand how this variability might modulate the AH properties of TR plants on nematodes is essential for the future implementation and use of these forages in farm conditions.

The first objective of this study was therefore to evaluate the consequences of plant variability, related to the environmental factors (origin, the stage and cycle of collection, year of collection) on the AH effect by using sainfoin as a plant model and *Haemonchus contortus* as a nematode model. In a second step, our objective was to explore, the possible role of some phenolic compounds in these antiparasitic properties based on the biochemical analysis of sainfoin samples presenting divergent effects with high and low AH activity.

## **Materials and Methods**

### **• Experiment 1**

In order to evaluate the variability in results related to the origin, variety or the stage of growth and to measure the potential AH effect of sainfoin extracts, the larvae migration inhibition (LMI) assay was chosen as a screening *in vitro* bioassay. This method is based on the inhibition of migration of the third stage infective larvae (L3) in presence of compounds with AH activity.

### • Plant samples and preparation of extracts

Overall, 32 samples of sainfoin (14, 10 and 8 samples collected respectively in 2006, 2007 and 2008) were analysed in this study. They were from 2 different varieties (Sepial, Ambra), grown in 3 regions of the Western part of France [Bioule (Tarn et Garonne, 82), Blars (Lot, 46), and Nallier (Vendée, 85)] and were collected at 3 different periods which corresponded to different phenological stages of the plant, start of flowering, flowering, 10 cm height and stage of leaves (see Table1) during the three years. All the plant samples were provided by the society "Caussade Semences" Ltd (4 additional samples were tested from a third variety Palio).

After being freeze-dried, five grams of each plant sample were grounded at 1mm by crushing, then extracted by shaking in an acetone:water (70:30) solution, for 1 hour in a water bath ( $T < 50^{\circ}\text{C}$ ). The filtrate was then concentrated under low pressure ( $T < 40^{\circ}\text{C}$ ), and washed 3 times with dichloromethane (3 x 50 ml) to remove chlorophyll and lipids. A grounded dry sample (in powder) of plant extract was eventually obtained after freeze-drying for 24 h, and was kept at  $4^{\circ}\text{C}$  until use.

### Measurements

#### • Biological activity

The biological activity (BA) of the plant samples, related to the tannin content, was measured using the Radial Diffusion Method (Hagerman and Butler, 1978). This test is based on the property of tannins to form complexes with proteins. We used Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich Ltd) as protein source and tannic acid (Sigma Ltd) as a standard. The diffusion of tannin content in the Petri dishes agar embedded with BSA leads to the formation of a precipitation ring which revealed the presence of tannins. The results were expressed in gr-equivalents of Tannic acid/100 gr of dry plant (DP). The Protein Precipitating Activity (PPA) is estimated by the diameter of the precipitation ring and is calculated according to the formula:  $\text{PPA} = [(D^2 - d^2) \times (\text{Vol. Extr.} / \text{Vol. Depos.})] / (m)$  [D: Diameter of ring (mm), d: diameter of well (mm), Vol. Extr.: Vol. of acetone 70% for extraction (κl), Vol. Depos.: Vol. deposited in the well (κl), m: Mass of plant utilized for extraction (gr)]

## Bioassays

### • Larval migration inhibition bioassay (LMI)

The LMI bioassay modified by Rabel et al, (1994) was used to evaluate the inhibiting effects of the sainfoin extracts, at different concentrations on 3 to 4-month-old ensheathed larvae of *H. contortus*. The L3 were obtained from a donor goat infected with a strain of *H. contortus*. Until use, the larvae were kept at 4°C.

For each plant extract, 3 ml of a larval solution of 1000 L3/ml were added to plastic tubes containing a similar volume of either Phosphate Buffered Saline (PBS, 0,1 M phosphate, 0,05 M NaCl, pH= 7,2), for negative control, or with a range of plant extract concentrations diluted with PBS. Four extract concentrations were examined per assay (150, 300, 600 or 1200 µg /ml). All incubations were carried out for 3h at 20°C. Thereafter, the L3 were washed and centrifuged (at 4500 rpm for 5 minutes) three times in 3 ml of PBS. After the last washing, 800 µl of the washed larval solution were transferred to inserts equipped with a 20 µm mesh, positioned in a conical tube, with the mesh just above a PBS solution. The mesh pore was selected in order to ensure that the larval migration through the pores was an active phenomenon. Three replicates were run for each plant concentration as well as for the negative control. After 3h at 20°C, the inserts were removed. The numbers of L3 which have migrated through the mesh were counted under a stereomicroscope at a X 40 magnification. The percentage of migration was calculated as  $M/T \times 100$ , where M is the number of L3 present in PBS, after migration and T the total number of L3 deposited in the insert.

### • Experiment 2

In order to ascertain the potential role of phenols and to understand which are the active compounds responsible for the sainfoin AH properties, an additional experiment was performed on 4 out of the 36 sainfoin samples. The selection of these 4 samples was based on the results of the LMI assay on *H. contortus*. Two of the selected samples have shown the highest and the two other, the lowest anthelmintic activity against the parasites. The extracts of these samples were sent to the Technical University of Munich (TUM) for biochemical analysis, concerning the qualitative and quantitative determination of different phenolic compounds, and to the Department of Agriculture, Chemistry & Biochemistry laboratory, University of Reading for further characterisation of tannins related to the mean degree of polymerisation, the Prodelphinidin(PD): Procyanidin(PC) and the cis:trans ratio of the tannins.

## Measurements

### • Folin-Ciocalteu assay

The Folin Ciocalteu method (Makkar, 2003) was used to determine the total polyphenols (TPs) and total tannins (TTs). After the initial measurements of TPs in the extracts, polyvinylpyrrolidone PVPP (Sigma Aldrich Ltd) was added to the extract then TTs were calculated as the difference between TPs measured with or without addition of PVPP in the same extract. The TPs and TTs were determined by recording the absorbance at 725 nm using a spectrophotometer (UV-Visible Spectronic Unicam, Genesys 8). A tannic acid standard curve was performed and the results were expressed as tannic acid equivalents.

### • Butanol - HCl assay

The butanol HCl method (Makkar, 2003) was used to estimate the CTs present in the various extracts. As the method is based on acid catalysed oxidative depolymerization of condensed tannins (CTs) into anthocyanidin. 0,5 ml of tannins extract was deposited in test tube in triplicate and 3,0 ml of butanol HCl and 0,1 ml of ferric reagent was added. The tubes, after covering their open side, were boiled for 60 minutes. A blank was used as a control. The tube was cooled to room temperature and the reading was taken at 550 nm absorbance with a spectrophotometer (UV-Visible Spectronic Unicam, Genesys 8). The results were expressed as leucocyanidin equivalents.

### • High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds

Samples of each extract were dissolved in water, centrifugated by 10000 rcf, for 10 min at 4°C and 10 µl of the obtained solutions were injected into HPLC. The quantification of phenolic compounds was performed using the HPLC method with diode array detection (DAD) and post-column derivatization with p-dimethyl-aminocinnamic aldehyde (DMACA) as described by Treutter et al, (1994) and Regos and Treutter, (2010).

### • Tannin analysis

Tannins were analysed by direct thiolysis of freeze-dried samples with benzyl mercaptan at 40°C for 1 h to obtain quantitative and qualitative information on tannins (Gea et al, 2011). Quantitative data refer to the content of extractable plus unextractable CT, whereas

qualitative data provide information on tannin structures, such as, mean degree of polymerisation (mDP) (i.e, molecular size), PD:PC and cis:trans ratios.

### **Statistical analyses**

All statistical analyses were realized using the SYSTAT 9 software. The statistical comparisons of differences in concentrations of tannins of 36 samples of sainfoin (according to the origin, the variety and the stage) were based on the results of the Analysis of Variance of 3 factors.

The antiparasitic effects for each sample were assessed, according to the treatment and to the dose, using the General Linear Model.

To take into account the effect of the different variables, the values of migration at 1200 µg/ml were compared according to a two way analysis of variance with the location being the first factor and alternatively, the year, the stage, the cycle and the variety.

The relationships between the biological activity of the plant samples and their antiparasitic properties, expressed as the percentage of larval migration, were analyzed by calculating Pearson's coefficients of correlation. This was performed overall, for the 3 years. In addition, the relationships depending on the different factors were also analysed respectively.

In addition, a multivariate analysis [(Multifactorial Correspondence Analysis (MCA)] was performed to examine the overall relationships between the following variables:

1/ Location (TG, LOT and VEN), 2/ Year (Y1,Y2, Y3), 3/ Stage of growth [(10cmHeight, leaves (LEA), start flowering (STFL) and flowering (FLO)], 4/ Variety [Ambra (A) or Sepial (S)], 5/ Cycle (C1,C2,C3) and 6/ Level of migration inhibition (ns, low, medium or high) :This MCA was performed without taking into account the Palio samples.

In experiment 2, the role of the different biochemical components according to the initial AH activity of the samples was assessed by use of a discriminant analysis.

## **Results**

### **• Experiment 1**



### • Variability in the biological activity

A high variability among the different sainfoin samples was found since the ratio between the highest (Ambra, October 16<sup>th</sup>, 2007, Bioule) and the lowest rate (Sepial, May 18<sup>th</sup> 2006, Vendée) of biological activity, as measured by radial diffusion assay, was 6,6 (Table 1).

The results of the statistical analysis according to the 3 factors (origin, variety and stage of plant development) indicated that the biological activity, related to the tannin content, was significantly affected by the geographical origin, the stage of development but not by the variety. The comparison of the mean values of the biological activity of sainfoin coming from different regions, varieties and plant stages was higher for the samples collected from Blars (Lot) [(Causse (Lot) ( $1,71 \pm 0,19$ ), Bioule ( $1,32 \pm 0,31$ ), Vendée ( $0,58 \pm 0,26$ ))] for the Ambra variety [Ambra ( $1,56 \pm 0,37$ ), Sepial ( $1,32 \pm 0,41$ ), Palio ( $1,00 \pm 0,17$ ) and for the stage of 10 cm height [10cm height ( $1,67 \pm 0,17$ ), start of flowering ( $1,53 \pm 0,31$ ), stage of leaves ( $1,34 \pm 0,18$ ), flowering ( $1,25 \pm 0,45$ )].

### • *In vitro* anthelmintic activity of sainfoin samples

For the negative control (PBS), the mean percentage of migration for the *H.contortus* larvae obtained throughout the 36 different assays was 91% ( $\pm 16,9$ ).

Out of the 36, 10 samples reduced significantly the migration of *H.contortus* larvae. Four of these samples originated from Bioule and 6 from Causse Lot. It is worth noting that two more samples, one coming from Bioule and another one from Causse Lot, showed a tendency ( $P < 0,1$ ) to reduce the larval migration.

Among the effective sainfoin samples, regarding the varieties, 6 were Ambra, 3 Sepial and 1 Palio. Concerning the stage of growth, 4 were collected at the flowering stage, 4 at the stage 10cm height and 2 at the start of flowering. The AH effect was significantly dose dependant for 6 out of these 10 samples (Table 1).

The results of the ANOVA 2 on the migration of larvae indicated significant differences depending on the location with values of migration related to the samples collected in Vendée being higher than those from Bioule and Causse Lot. In addition, significant effects were found depending respectively on the year and on the cut number with the values of larval migration for year 3 and cut 3 being lower than for the other times.

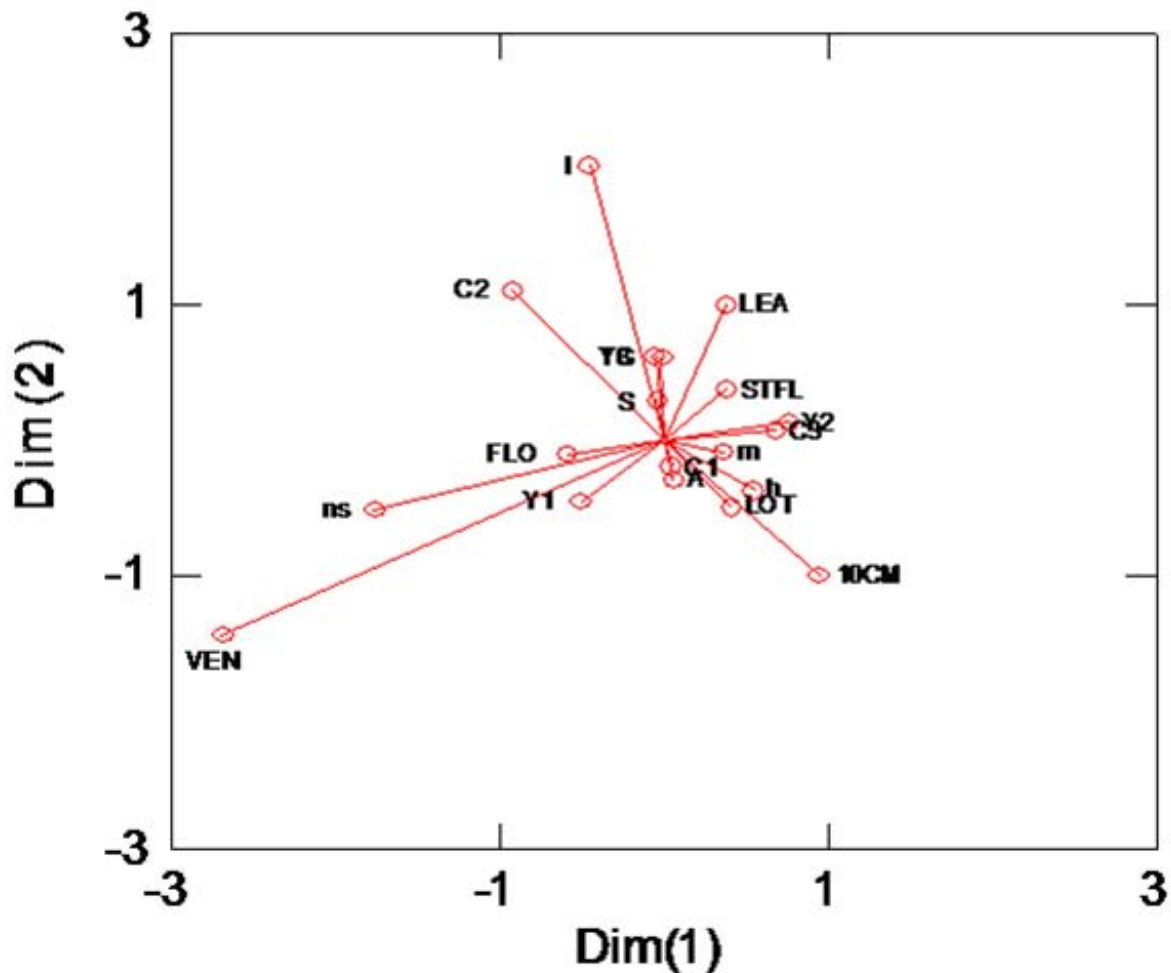
Results of the MCA are illustrated on figure 1. The main results showed a relationship between the low values of inhibition (ns, or I) and the Vendée location, the year 1 as well as

the flowering stage. In contrast, the high values of inhibition were rather associated with the Causse Lot location, the variety Ambra, year 3 and the cycle 3. (Annex A)

**Table 1. Mean measurements ( $\pm$  S.D.) of the biological activity (BA) by the radial diffusion method and the percentage of inhibition at the highest concentration tested, for 36 sainfoin samples of 3 different varieties coming from 3 different origins, collected at 4 different stages during 2006, 2007 and 2008. The results of the statistical analysis concerning the treatment and the dose effect of the samples tested against the larvae of *H. contortus* by using the LMI assay are also included in the table.**

SAINFOIN SAMPLES (CAUSSADES SEMENCES)						AH ACTIVITY	
ORIGIN	VARIETY	CYCLE and STAGE of GROWTH	YEAR	BA	PERCENT of INHIBITION 1200 $\mu$ g/ml	TREATMENT EFFECT	DOSE EFFECT
Bioule (82)	Sepial	1/Flowering	15/06/2006	0,925 ( $\pm$ 0,12)	18,1	P<0,01	P<0,01
	Ambra	1/Flowering	15/06/2006	1,025 ( $\pm$ 0,05)	0	NP	NP
	Palio	1/Flowering	15/06/2006	0,880 ( $\pm$ 0,07)	0	NP	NP
	Sepial	1/Flowering	30/06/2006	0,940 ( $\pm$ 0,03)	17,5	NS	P<0,01
	Ambra	1/Flowering	30/06/2006	1,290 ( $\pm$ 0,07)	14,8	NS	P<0,05
	Palio	1/Flowering	30/06/2006	1,205 ( $\pm$ 0,32)	7,3	NS	NS
	Sepial	2/ Flowering	20/07/2006	1,115 ( $\pm$ 0,05)	8,9	NS	NS
	Ambra	2/ Start of Flowering	20/07/2006	1,680 ( $\pm$ 0,17)	24,5	P<0,05	P<0,01
	Palio	2/ Flowering	20/07/2006	1,090 ( $\pm$ 0,14)	17,2	P<0,05	P<0,01
Causse Lot (46)	Sepial	1/10 cm Height	30/06/2006	1,955 ( $\pm$ 0,08)	42	P<0,01	P<0,01
	Ambra	1/10 cm Height	30/06/2006	1,745 ( $\pm$ 0,18)	38,5	P<0,05	P<0,01
	Sepial	1/Flowering	19/07/2006	1,745 ( $\pm$ 0,18)	24,5	NS	P<0,05
	Ambra	1/ Start of Flowering	19/07/2006	1,900 ( $\pm$ 0,00)	48,3	NS	P<0,01
	Sepial	3/Flowering	18/10/2006	1,755 ( $\pm$ 0,06)	16,3	NS	P<0,05
	Ambra	3/Flowering	18/10/2006	1,875 ( $\pm$ 0,09)	21,2	P<0,01	P<0,01
Vendee (85)	Sepial	1/Flowering	18/05/2006	0,310 ( $\pm$ 0,00)	0	NP	NP
	Ambra	1/Flowering	18/05/2006	0,590 ( $\pm$ 0,11)	0	NP	NP
	Palio	1/Flowering	18/05/2006	0,840 ( $\pm$ 0,08)	14,6	NS	NS
Bioule (82)	Sepial	1/ Start of Flowering	24/04/2007	1,195 ( $\pm$ 0,02)	5,1	NS	NS
	Ambra	1/ Start of Flowering	24/04/2007	1,310 ( $\pm$ 0,10)	19,6	NS	NS
	Sepial	2/ Flowering	15/06/2007	1,485 ( $\pm$ 0,05)	26,6	P<0,1	NS
	Ambra	2/ Flowering	15/06/2007	1,625 ( $\pm$ 0,05)	23,6	NS	NS
	Sepial	3/ Flowering	16/10/2007	1,705 ( $\pm$ 0,35)	28,7	NS	NS
	Ambra	3/ Flowering	16/10/2007	2,050 ( $\pm$ 0,24)	40,7	P<0,01	NS
Causse Lot (46)	Sepial	1/10 cm Height	20/03/2007	1,470 ( $\pm$ 0,03)	19,5	NS	P<0,01
	Ambra	1/10 cm Height	20/03/2007	1,615 ( $\pm$ 0,02)	31,2	P<0,02	NS
	Sepial	1/Flowering	10/05/2007	1,300 ( $\pm$ 0,11)	19,3	P<0,1	NS
	Ambra	1/Start of Flowering	10/05/2007	1,860 ( $\pm$ 0,00)	16,2	P<0,05	NS
Bioule (82)	Sepial	1/ Stage of Leaves	02/04/2008	1,215 ( $\pm$ 0,01)	10,3	NS	NS
	Ambra	1/ Stage of leaves	02/04/2008	1,470 ( $\pm$ 0,07)	0	NP	NP
	Sepial	1/ Start of Flowering	24/04/2008	1,090 ( $\pm$ 0,00)	16,1	NS	NS
	Ambra	1/ Start of Flowering	24/04/2008	1,500 ( $\pm$ 0,04)	34,8	NS	P<0,07
	Sepial	2/ Flowering	10/06/2008	1,155 ( $\pm$ 0,14)	9,4	NS	NS
	Ambra	2/ Start of Flowering	10/06/2008	1,735 ( $\pm$ 0,08)	2,3	NS	NS
Causse Lot (46)	Sepial	1/ 10 cm Height	15/05/2008	1,690 ( $\pm$ 0,01)	10,6	P<0,05	NS
	Ambra	1/ 10 cm Height	15/05/2008	1,555 ( $\pm$ 0,02)	27,6	NS	P<0,04

Figure 1. Principal plane illustrating the overall relationships obtained from the multivariate analyses (MCA) between the following variables: location (TG, LOT and VEN), Year (Y1,Y2, Y3), Stage [(10cmHeight, leaves (LEA), start flowering (STFL) and flowering (FLO)], variety [Ambra (A) or Sepial (S)], cycle (C1,C2,C3) and the level of migration inhibition (ns, l, m and h). The analyses variability is 30%.



- Relation between the AH and the biological activity of sainfoin

The relation between the biological activity, as measured by the radial diffusion assay, of the sainfoin samples and their effect on the migration of *H. contortus* larvae was estimated by calculating the coefficient of Pearson correlation. In order to globally analyse the relationship between the biological activity and the antiparasitic properties of sainfoin samples, the migration of larvae were related to the biological activity per concentration of extract used by giving an arbitrary reference value to 600 $\mu$ g/ml (150  $\mu$ g / ml = X / 4 and 300  $\mu$ g / ml = X / 2,

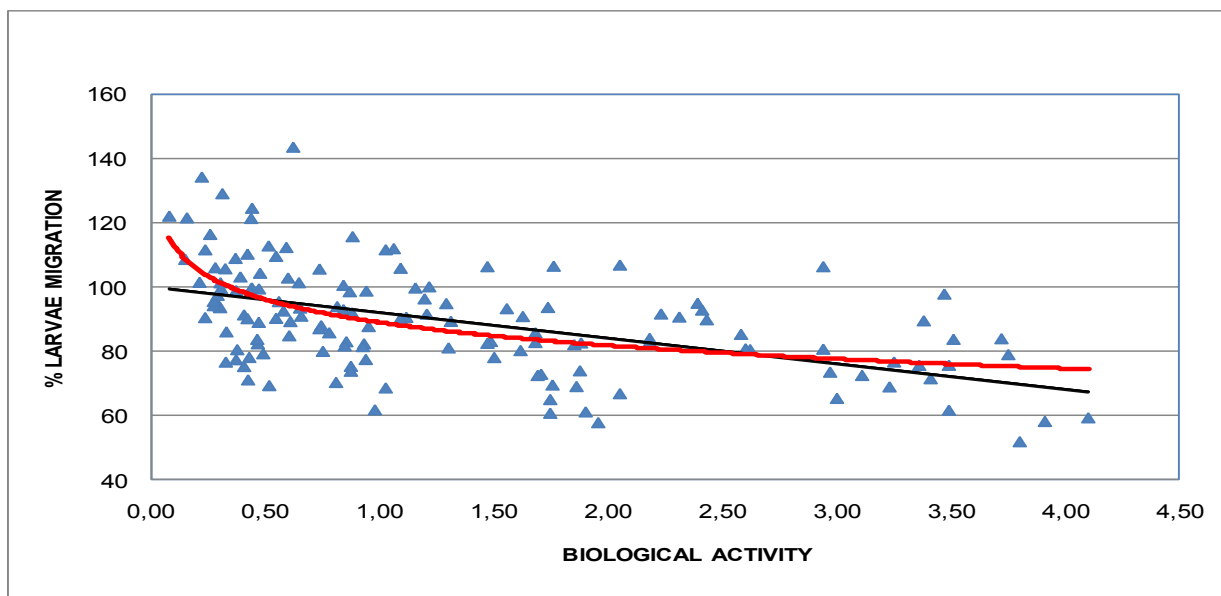
600kg/ml = X, 1200 µg / ml = 2X). The global illustration of the relation between the biological activity and the larvae migration inhibition is shown in figure 2.

The overall coefficient between the biological activity and the migration (for the 4 concentrations, df=142) was found negative ( $r = -0,51$ ) and significant ( $P < 0,001$ ). The value of logarithmic and linear equation was found  $R^2 = 0,256$  ( $P < 0,001$ ) and  $R^2 = 0,295$  ( $P < 0,001$ ) respectively.

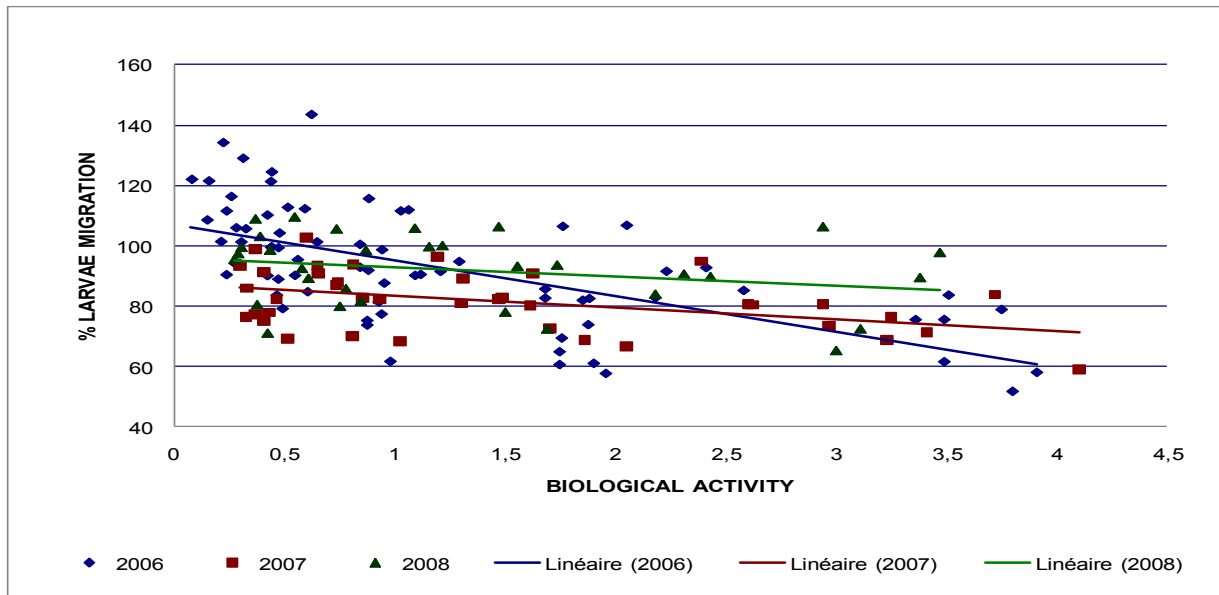
For each year, the values of  $r$  were also found negative and were respectively  $R^2 = 0,39$  for 2006 (df = 70  $P < 0,05$ ),  $R^2 = 0,39$  for 2007 (df = 38, NS) and  $R^2 = 0,07$  for 2008 (df = 30, NS) (Figure 3)

Depending on the location, the coefficient were also negative, the  $R^2$  values being respectively  $R^2 = 0,202$  for Bioule (df = 82,  $P < 0,05$ ),  $R^2 = 0,215$  for the Causse Lot samples (df = 46,  $P < 0,05$ ) and  $R^2 = 0,17$  for Vendée (df = 10, NS) (Figure 4). Last depending on the variety, the correlation coefficient were also negative being  $R^2 = 0,27$  (df = 58,  $P < 0,05$ ) for Ambra and  $R^2 = 0,23$  (df = 62,  $P < 0,05$ ) for Sepial (Figure 5)

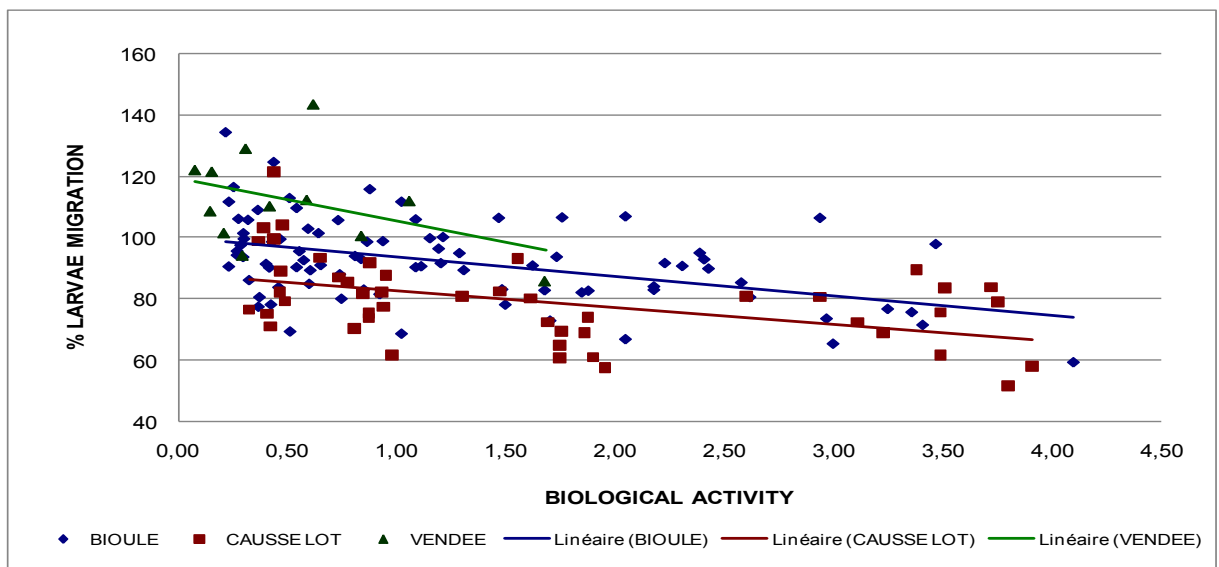
**Figure 2. Relation between the percentage of the larvae migration of *H.contortus* in the presence of the sainfoin extracts (1200, 600, 300, 150µg/ml) of Bioule, Causse Lot and Vendee related to the biological activity. The negative control (PBS) is indicated by the line 100%. The logarithmic and the linear relationship is demonstrated in the figure by the red and the black line, respectively.**



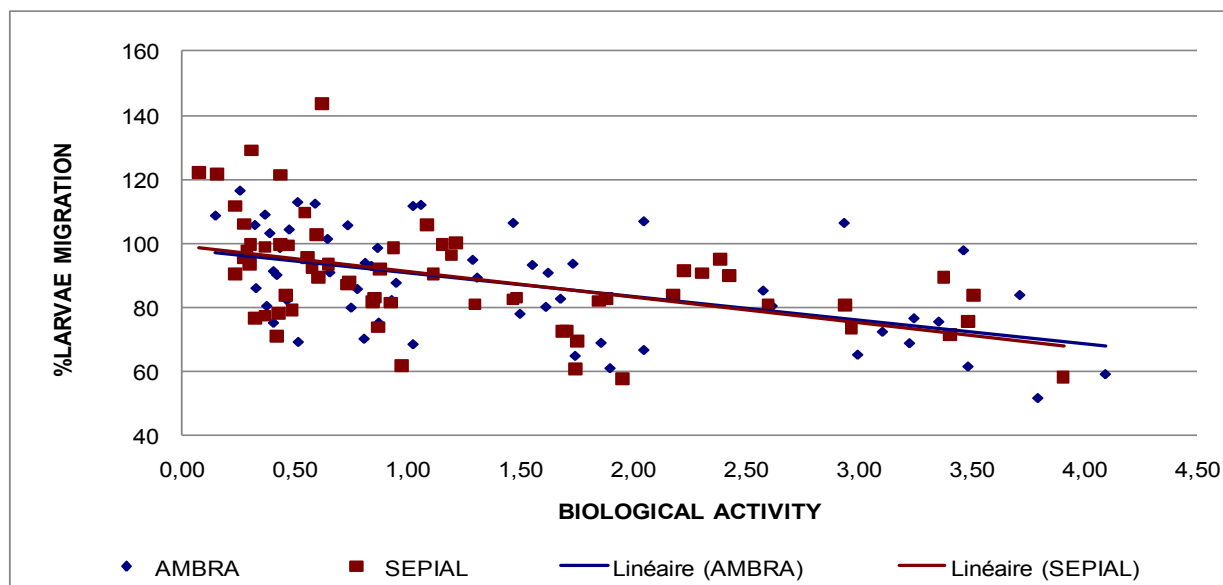
**Figure 3.** Relation between the percentage of the larvae migration of *H.contortus* in the presence of the sainfoin extracts (1200, 600, 300, 150µg/ml) of 2006, 2007 and 2008 related to the biological activity. The linear relationship between them is demonstrated in the figure. The negative control (PBS) is indicated by the line 100%.



**Figure 4.** Relation between the percentage of the larvae migration of *H.contortus* in the presence of the sainfoin extracts (1200, 600, 300, 150µg/ml) of different origin (Causse Lot, Bioule and Vendée) related to the biological activity. The linear relationship between them is demonstrated in the figure. The negative control (PBS) is indicated by the line 100%.



**Figure 5. Relation between the percentage of the larvae migration of *H.contortus* in the presence of the sainfoin extracts (1200, 600, 300, 150µg/ml) of Ambra and Sepial varieties related to the biological activity. The linear relationship between them is demonstrated in the figure. The negative control (PBS) is indicated by the line 100%.**



## • Experiment 2

According to the LMI results the sainfoin samples, Ambra and Sepial, collected in mid October 2007 in Bioule, were the most effective against *H.contortus* larvae since the inhibition of migration at the highest concentration reached 41% for Ambra and 29% for Sepial. The biological activity of these samples, as measured by the radial diffusion assay was the highest ones observed, among the samples of Ambra variety (2,050) as well as for Sepial (1,705) (see table 1). In contrast, two other sainfoin samples of Ambra and Sepial variety, collected in Vendée in mid May 2006, did not show any AH activity against *H.contortus*. It is worth noting that these 2 samples also showed the lowest biological activity, (Ambra 0,59 and Sepial 0,31 respectively), among the samples tested (see Table 1).

According to the results of the Folin-Ciocalteu method the samples from Bioule contain approximately 1,5 times more total phenols and total tannins than the samples from Vendée. Concerning the condensed tannin content, as measured by the Butanol-HCl method, was 7 times higher in the Bioule samples than in Vendée ones ( $P < 0,03$ ). Regarding the biological activity, it was 4 times higher in the Bioule samples than in those from Vendée ( $P < 0,03$ ).

In regard of the content for the different phenolic categories (biochemical families), the main differences were found in the flavonols and flavanols (Table 2).

**Table 2. Biochemical characteristics of the 2 samples with low (Vendée) and 2 with high (Bioule) AH activity, concerning quantitative values for total phenols, total tannins, condensed tannins and polyphenolic content and the tannin characterisation related to the mDP, PD:PC and cis:trans ratios. The results of a discriminant analysis is shown in the last column.**

	Vendée		Bioule		Statistical analysis
	Sepial	Ambra	Sepial	Ambra	
% inhibition at 1200µg/ml	0	0	28,67	40,86	
% inhibition at 600µg/ml	0	0	27,2	33,33	
<b>General measurements</b>					
Total phenols (% TP/DM)	5,99	5,98	7,82	10,11	NS
Total tannins (% TT/DM)	1,31	1	0,97	2,23	NS
Condensed tannins (% CT/DM)	1,01	1,56	7	9,46	P<0,03
Biological activity	0,31	0,59	1,71	2,05	P<0,03
<b>Small phenolic compounds (µmol/g DW)</b>					
Total amino acids	4,34	3,13	0,83	0,72	P<0,03
Total simple phenolic acids	24,79	23,18	27,25	35,86	NS
Total hydroxybenzoic acids	108,91	104,08	39,73	41,42	NS
Total hydroxycinnamic acids	11,53	10,87	19,16	26,07	P<0,08
Total flavones	2,85	7,95	5,78	6,42	NS
<b>Flavonols (µmol/g DW)</b>					
Quercetin 3-glucoside	1,25	1,89	2,65	4,01	NS
Quercetin 3-rutinoside	39,86	31,33	63,23	79,25	P<0,06
Quercetin 3-rhamnosylrutinoside	2,93	4,32	1,97	2,57	NS
Kaempferol 3-rutinoside	6,99	6,53	11,36	12,6	P<0,02
Isorhamnetin 3-rutinoside	7,21	4,82	12,76	13,29	P<0,03
Other glucosylated flavonols	5,07	13,94	12,71	16,99	NS
Acetylated flavonols	3,32	3,43	4,73	5,9	P<0,08
Total flavonols	66,63	66,26	109,41	134,62	P<0,05
<b>Monomeric flavanols and other oligomeric proanthocyanidins (µmol/g DW)</b>					
Catechin	4,54	8,97	41,32	73,82	NS
Epicatechin	8,51	6,44	93,04	125,14	P<0,02
Gallocatechin	0	35,16	124,62	164,61	P<0,05
Epigallocatechin	23,38	35,29	262,93	309,73	P<0,01
Procyanidin B2	0	1,49	14,88	14,99	P<0,01
Other soluble flavanols & oligomericPAs	0	0	86,23	141,42	P<0,05
Total flavanols	36,44	87,35	623,01	829,71	P<0,02
<b>Tannin characterisation</b>					
mean degree of polymerisation (mDP)	45,78	35,88	27,47	25,34	NS
mean prodelfinidin (PD)	71,1	71,7	81,9	82,1	P<0,001
mean procyanidin (PC)	28,9	28,3	18,1	17,9	P<0,001
mean cis	75	80	78,5	84,2	NS
mean trans	25	20	21,5	15,8	NS

Based on the discriminant analysis, no statistical differences were found in the small phenolic compounds except for the total amino acids ( $P < 0,03$ ) and total hydroxycinnamic acids ( $P < 0,08$ ). However statistical differences observed for the amino acids content corresponded to lower values in the active samples.

In contrast, significant differences in the total content of flavonols were found 1,8 times higher in Bioule compared to the Vendée samples ( $P < 0,05$ ). The differences between the samples, observed in various flavonols, were always higher in Bioule samples and significant for kaempferol 3-rutinoside ( $P < 0,02$ ), isorhamnetin 3-rutinoside ( $P < 0,03$ ) and close to significance for quercetin 3-rutinoside ( $P < 0,06$ ).

Significant differences were also observed in the total flavanol content. The samples from Bioule contained, 12 times more flavanols than those from Vendee ( $P < 0,02$ ), (see table 2). It is worth noting that the differences observed, between the samples, in epicatechin ( $P < 0,02$ ), galocatechin ( $P < 0,05$ ), epigallocatechin ( $P < 0,01$ ), dimers of procyanidin ( $P < 0,01$ ), in other soluble flavanols and oligomeric proanthocyanidin ( $P < 0,05$ ) were significant and at least 8 times higher in Bioule samples when compared of those of Vendée.

Moreover, concerning the tannin characterization, no significant difference was observed in the mDP values between high and low activity samples, although lower values were observed in the samples from Bioule. No statistical difference was found in the cis:trans ratios among the samples. In contrast, a statistical difference was observed related to the PD:PC ratio ( $P < 0,001$ ) with higher values being observed in the samples from Bioule.

## Discussion

The present study confirms that sainfoin extracts have the ability to inhibit the migration of the infective L3 larvae of *H. contortus in vitro*, as previously shown in other *in vitro* studies examining the larvae mobility (Molan et al, 2000a, 2000b; Paolini et al, 2004; Barrau et al, 2005; Manolaraki et al, 2010).

One hypothesis to explain the possible AH activity of sainfoin relies on a pharmacological like effects due to some of the PSMs present in the plant. This so called “direct” hypothesis is particularly supported by multiple *in vitro* results and a few *in vivo* studies (Athanasiadou et al, 2001; Paolini et al, 2003). It relies on the possibility that condensed tannins but also some other phenolics could have anthelmintic properties by themselves by affecting several key biological processes of the worm (Barrau et al, 2005; Brunet and Hoste, 2006; Hoste et al, 2006; Brunet et al, 2008). Therefore any variability in phenols might affect the AH.



Our main objectives were to verify how factors related to the plant and the environment affect the AH activity of sainfoin, and to begin to explore how this variability relates with quantitative and /or qualitative changes in the phenolic compounds like CTs, flavonols or flavanols.

Our results suggest the occurrence of such a variability, since 10 out of the 36 sainfoin samples significantly inhibited the L3 migration of *H.contortus*. Based on the results of the ANOVA comparison and of a multiple correspondence analysis, between the different variables and the inhibition of L3 migration, this variability seems to relate to the location, and year of growth as well as to the cycle but to a low extent to the stage of growth.

With regard to the cultivation location, the samples from Vendée were associated with no or low AH activity. In contrast, those from Causse du Lot and Bioule were more related to higher AH activities. We could suppose that these differences might relate either to differences in climatic or soil conditions of these regions. It is known that the sainfoin is best adapted to grow in soils with basic pH = 6,6-8 (USDA, NRCS, 2008), which is the case in the Causse du Lot region.

To our knowledge, there is no previous study examining the effect of various environmental factors on the AH properties on Legume forages. However, the overall effects of different environmental conditions on the quantity and the quality of CTs have been mentioned in several previous studies.

With regard to the quantity of CTs, the influence of the cultivation location on polyphenol concentration was demonstrated by Tiemann et al, (2010). This seemed to be more related to the pH values (Kraus et al, 2004) than the soil fertilization (Tiemann et al, 2010). Caygill and Mueller Harvey, (1999) have noticed that the synthesis of tannins in plants is a response to stress conditions, such as low fertility, water deficits or high temperature. The positive effect of a hot dried period on the flavan-3ols concentrations in plants have also been described in several studies (Feutch et al, 1997; Donnelly, 1959; Lascano (internet site); Lees et al, 1994; Vitti et al, 2005; Assefa et al, 2008).

On the other hand, the type of soil has also been shown to influence the quality of tannins since sandy soils with low water content seemed to be negatively related to the prodelphinidin content (Cadot and Minana Castello, 2006). Moreover, Tiemann et al, (2010) have indicated the effect of the fertilisation in the properties CTs since the increase, observed in the astringency of CTs of two Fabacea family belonging plant extracts, after fertilization, was not associated with quantitative differences.

In relation with the plant cycle, the main variations in AH activity mainly referred to the cycle and year of growth. The samples collected in October (third cut) and in year 3 have shown higher AH activity when compared to the others. These differences might be explained by some reaction to the stress of the plant after increased number of cutting which could lead to high tannin synthesis.

As far the influence of the stage of growth was concerned, the differences were less prominent than with the 3 previous factors although some indication the MCA suggest that the stage of flowering was associated with lower AH activity.

Last, no major differences have been observed in AH activity depending on the sainfoin variety. However, only two varieties (Ambra, Sepial) were included in the study and this very low number strongly limit the interpretation of the results. The effect of this factor on the sainfoin AH properties will be examined more widely in another study (chapter 3).

Our global results suggest that there is a linear and/or a logarithmic relationship between the biological activity, as measured by the radial diffusion assay, and the AH activity of sainfoin extracts, as illustrated in figure 2. According to our results, it can also be hypothesized that a threshold concentration must be reached in order to observe the AH properties.

Based on these wide divergences in AH properties between the samples, the experiment 2 was designed in order to examine whether some main differences in the biochemical composition in tannins and phenols can be related to the activity based on the analysis of samples selected on their high and low AH activity. The compounds identified are in agreement with those quoted by Regos and Treutter, (2010) or Lu et al, (2000). The main significant differences observed in these different phenols and tannins (see Table 2) can be summarised as follows:

Concerning the general measurements, the results have not shown significant differences between the active and the inactive samples for TP and TT. In contrast, significant differences were found for the CT contents and the measurement of biological activity, which is related to the property of tannins to bind proteins, with higher values in the Bioule samples.

Concerning the quality and nature of tannins, no statistical differences were observed neither in the cis:trans ratio nor in the mean DP, even though lower mDP values were measured in the samples with the higher AH activity. These more active samples coincided also with the higher PD:PC ratio.

For the monomeric flavanols and proanthocyanidins, significant differences were found for all the monomers listed except for catechin.

It is worth noting that the Bioule samples contained approximately 10-fold higher catechin/epicatechin and galliccatechin/epigallocatechin content than the Vendée samples. This is in agreement with previous *in vitro* studies that have shown that the prodelphinidin monomers and the galloyl derivatives were more potent inhibitors of the egg development, of the larval mobility, (Molan et al, 2003; 2004) and of the larval exsheathment and penetration in the mucosa (Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al, 2008). The higher inhibitory activity of PD monomers seems to be related to the total numbers of hydroxyl groups contained (PD=3OH, PC=2OH) which might favour hydrogen bonds to bind to proteins (Molan et al, 2003; Brunet and Hoste, 2006). Moreover, the dimers and oligomers of flavanols seems also to affect the AH properties of sainfoin since the difference between high and low AH properties samples was significant.

Main differences were also found in the flavonol contents between the 2X2 divergent samples. Those from Bioule contained 2-fold higher overall flavonol contents than the Vendée ones. This general difference was noticeably explained by significant differences in quercetin-3-rutinoside, kaempferol-3-rutinoside and isorhamnetin-3-rutinoside. These observations are in agreement with Barrau et al, (2005) which first mentioned the possible implication of flavonols (rutin, narcissin and nicotiflorin) in the anthelmintic properties of sainfoin against GINs.

Last, although mainly no differences were found in the other phenolic compounds present in the sainfoin samples, it is worth to mention that this is the first time that a possible role for hydroxycinnamic acids in the AH activity was suggested.

This is the first time that the relationship between several factors related to the environment and the plant (cycle, stage of growth) and AH activity of sainfoin was evaluated. Overall the results underlined the complexity of these relations. Even though the role of CTs in the sainfoin seemed confirmed, it seems that other phenolic compounds were also implicated in this property. The effect of the biochemical characteristics of CTs on the AH properties are also needed to be studied. Such information may provide guidance for plant breeders aiming to improve the AH activity of sainfoin and to use it more efficiently.

## References

- Assefa, G, Sonder, K, Wink, M, Kijora, C, Steinmueller, N, Peters, K.J, 2008. Effect of variety and harvesting management on the concentration of tannins and alkaloids in tagasaste (*Chamaecytisus palmensis*). *Animal Feed Science and Technology* 144, 242-256.
- 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.
- Athanasiadou, S, Tzamaloukas, O, Kyriazakis, I, Jackson, F, Coop, R.L, 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Veterinary Parasitology* 127, 233-243.
- 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, Aufrere, J, El Babili, F, Fouraste, I, Hoste, H, 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Brunet, S, Jackson, F, Hoste, H, 2008. 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.
- Bruneton, J, 1999. Tannins. In: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, TEC&DOC (Ed), Paris, pp. 369-404.
- Cadot, Y., Minana Castello, M.T., Chevalier, M., 2006. Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera* L. cv *Cabernet Franc*) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta* 563, 65-75.
- Caygill, C.J., Mueller-Harvey, I., 1999. *Secondary Plant Products: Antinutritional and beneficial actions in animal feeding*. Nottingham University Press, UK (p 129).
- Dimander, S, Höglund, J, Waller, P.J, 2003. Seasonal translation of infective larvae of gastrointestinal nematodes of cattle and the effect of *Duddingtonia flagrans*: a 3-year plot study. *Veterinary Parasitology* 117, 99-116.
- Donnelly, E.D, 1959. The effect of season, plant maturity and height on the tannin content of *Sericea lespedeza*, *L.cuneata*. *Agronomy Journal* 51, 71-73.
- Doner, W.L, Becard, G, Irwin, L.P, 1993. Binding of flavonoids by polyvinylpolypyrrolidone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 753-757.
- Feucht, W., Treutter, D., Christ, E., 1997. Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiology* 17, 335-340.

- Foo, L.Y, Jones, W.T, Porter, L.J, Williams, V.M, 1982. Proanthocyanidin polymers of fodder legumes. *Phytochemistry* 21, 933-935.
- Gea, A, Stringano, E, Brown, R.H, Mueller-Harvey, I, 2011. *In situ* analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high throughput germplasm screening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59, 495-503.
- Hagerman, E.A, Butler, G.L, 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 809–812.
- Haring, A, 2007. Determinants of tannin concentrations in forage plants. Agronomic potential of tanniferous plants. PhD thesis submitted to the Swiss Federal Institute of Technology, Zurich (p 226).
- Heckendorn, F, Häring, D.A, Maurer, V, Zinsstag, J, Langhans, W, Hertzberg, H, 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* 142, 293-300.
- Heckendorn, F, Haring, D.A, Maurer, V, Senn, M, Hertzberg, H, 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology* 146, 123-134.
- Hedqvist, H, Mueller-Harvey, I, Reed, J.D, Krueger, C.G, Murphy, M, 2000. Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology* 87, 41-56.
- 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.
- Jackson, S.F, Barry, T.N, 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 103-110.
- Jones, W.T, Mangan, W.T, 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 126-136.
- Kaplan, R.M, 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* 20, 477-481
- Koupai-Abyazani, M.R, Muir, A.D, Bohm, B.A, Towers, G.H.N, Gruber, M.Y, 1993. The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry* 34, 113-117.
- Kraus, T.E.C, Zasoski, R.J, Dahlgren, A.R, 2004. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil* 262, 95-109.
- Lascano, C.E, Schmidt, A, Barahona, R, Forage quality and the environment. [www.internationalgrasslands.org/papers/pdfs/tema9\\_1.pdf](http://www.internationalgrasslands.org/papers/pdfs/tema9_1.pdf).

- Lascano, C.E, Avila, P, Stewart, J.T, 2003. Intake, digestibility and nitrogen utilization by sheep fed with provenances of *Calliandra calothyrsus* Meissner with different tannin structure. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal* 11, 1-8.
- Lees, G.L., Hinks, C.F., Suttill, N.H., 1994. Effect of high temperature on condensed tannin accumulation in leaf tissues of big trefoil (*Lotus uliginosus* Schkuhr). *Journal of the Science of the Food and Agriculture* 65, 415-421.
- Lorimer, S.D, Perry, N.B, Foster, L.M, E.J, B, Douch, P.G.C, Hamilton, M.C, Donaghy, M.J, McGregor, R.A, 1996. A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2842-2845.
- Lu, Y, Sun, Y, Foo, L.Y, McNabb, W.C, Molan, A.L, 2000. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry* 55, 67-75.
- Makkar, H.P, 2000. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. In: *A Laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy (FAO / IAEA), Vienna, Austria* (p 26).
- Manolaraki, F, Sotiraki, S, Stefanakis, A, Skampardonis, V, Volanis, M, Hoste, H, 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 685-696.
- Marais, J.P.J, Mueller-Harvey, I, Brandt, E.V, Ferreira, D, 2000. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3440-3447.
- Min, B.R., Hart, S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science* 81, 102-109.
- Molan, A.L, Hoskin, S.O, Barry, T.N, McNabb, W.C, 2000a. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Veterinary Record* 147, 44-48.
- Molan, A.L, Waghorn, G.C, Min, B.R, McNabb, W.C, 2000b. The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitology (Praha)* 47, 39-44.
- Molan, A.L, Waghorn, G.C, McNabb, W.C, 2002. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Veterinary Record* 150, 65-69.
- 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 of Parasitology* 33, 1691-1698.
- Molan, A.L, Sivakumaran, S, Spencer, P.A, Meagher, L.P, 2004. Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Research in Veterinary Science* 77, 239-243.
- Mueller-Harvey, I, 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2010 - 2037.



- Niezen, J.H, Charleston, W.A.G, Robertson, H.A, Shelton, I.D, Waghorn, G, 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
- Paolini, V, Dorchies, P, Hoste, H, 2003. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Veterinary Record* 152, 600-601.
- Paolini, V, Fouraste, I, Hoste, 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.
- Paolini, V, De La Farge, F, Prevot, F, Dorchies, P, Hoste, H, 2005a. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 127, 277-283.
- Paolini, V, Prevot, F, Dorchies, P, Hoste, H, 2005b. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *The Veterinary Journal* 170, 260-263.
- Rabel, B, McGregor, R, Douch, P.G.C, 1994. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International Journal for Parasitology* 24, 671-676.
- Regos, I, Treutter, D, 2010. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Chromatography A* 1217, 6169-6177.
- Shaik, S.A, Terrill, T.H, Miller, D, Kouakou, B, Kamman, G, Kallu, R.K, Mosjidis, J, 2004. Effects of feeding sericea lespedeza hay to goats infected with *Haemonchus contortus*. *South African Journal of Animal Science* 34, 234-237
- Shaik, S.A, Terrill, T.H, Miller, J.E, Kouakou, B, Kannan, G, Kaplan, R.M, Burke, J.M, Mosjidis, J.A, 2006. Sericea lespedeza hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology* 139, 150-157.
- Singh, S, McCallum, J, Gruber, M.Y, Neil Towers, G.H, Muir, A.D, Bohm, B.A, Koupai-Abyazani, M.R, Glass, A.D.M, 1997. Biosynthesis of flavan-3-ols by leaf extracts of *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry* 44, 425-432.
- Thamsborg, S.M, Mejer, H, Bandier, M, Larsen, M, 2003. Influence of different forages on gastrointestinal nematode infections in grazing lambs. In: the 19th International Conferences of WAAVP, New Orleans, USA (p 189).
- Tiemann, T.T, Franco, L.H, Ramírez, G, Kreuzer, M, Lascano, C.E, Hess, H.D, 2010. Influence of cultivation site and fertilisation on the properties of condensed tannins and *in vitro* ruminal nutrient degradation of *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla* and *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology* 157, 30-40.
- Treutter, D., Santos-Buelga, C., Gutmann, M., Kolodziej, H., 1994. Identification of flavan 3ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *Journal of Chromatography* 667, 290-297.

- Tzamaloukas, O, Athanasiadou, S, Kyriazakis, I, Jackson, F, Coop, R.L, 2005. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. *International Journal for Parasitology* 35, 329-335.
- USDA, NRCS, 2008. The Plants Database (<http://plants.usda.gov>, 22 February 2008), National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- Vitti, D.M.S.S, Nozella, E.F, Abdalla, A.L, Bueno, I.C.S, Filho, J.C.S, Costa, C, Bueno, M.S, Longo, C, Vieira, M.E.Q, Filho, S.L.S.C, Godoy, P.B, Mueller-Harvey, I, 2005. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. *Animal Feed Science and Technology* 122, 123-133.
- Waller, P.J, Thamsborg, S.M, 2004. Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology* 20, 493-497.
- Waller, P.J, 2006. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology* 139, 1-14.
- Wang, P.X, Ueberschär, K.H, 1990. The estimation of vicine, convicine and condensed tannins in 22 varieties of fababeans (*Vicia faba L.*). *Animal Feed Science and Technology* 31, 157-165.
- Wolstenholme, A.J, Fairweather, I, Prichard, R, Samson-Himmelstjerna, G.V, Sangster, N.C, 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20, 469-476.



**ANNEXE****A. MULTICOMPONENT FACTORIEL ANALYSES**

Categorical values encountered during processing are:

INH12000\$ (4 levels)  
 h, l, m, ns  
 AN\$ (3 levels)  
 Y1, Y2, Y3  
 LOCATION\$ (3 levels)  
 LOT, TG, VEN  
 CYCLES\$ (3 levels)  
 C1, C2, C3  
 VAR\$ (2 levels)  
 A, S  
 STADE\$ (4 levels)  
 10CM, FLO, LEA, STFL

Multiple Correspondence Analysis

Factor	Eigenvalue	Percent	Cum Pct	
1	0.341	15.75	15.75	-----
2	0.311	14.35	30.11	-----
3	0.274	12.62	42.73	-----
4	0.257	11.84	54.58	----
5	0.222	10.23	64.81	----
6	0.201	9.28	74.09	---
7	0.137	6.31	80.40	--
8	0.116	5.36	85.76	--
9	0.105	4.85	90.61	-
10	0.090	4.15	94.76	-
11	0.055	2.54	97.30	-
12	0.035	1.59	98.89	
13	0.024	1.11	100.00	
Sum	2.167	(Total Inertia)		

Variable Coordinates

Name	Mass	Quality	Inertia	Factor 1	Factor 2
h	0.068	0.296	0.099	0.545	-0.368
l	0.021	0.616	0.146	-0.457	2.026
m	0.052	0.061	0.115	0.357	-0.081
ns	0.026	0.624	0.141	-1.766	-0.501
Y1	0.073	0.353	0.094	-0.509	-0.442
Y2	0.052	0.268	0.115	0.757	0.130
Y3	0.042	0.126	0.125	-0.056	0.611
LOT	0.073	0.312	0.094	0.405	-0.486
TG	0.083	0.365	0.083	-0.018	0.604
VEN	0.010	0.620	0.156	-2.694	-1.429
C1	0.125	0.120	0.042	0.042	-0.196
C2	0.021	0.297	0.146	-0.926	1.106
C3	0.021	0.066	0.146	0.675	0.068
A	0.083	0.086	0.083	0.051	-0.288
S	0.083	0.086	0.083	-0.051	0.288
10CM	0.031	0.432	0.135	0.948	-0.987
FLO	0.083	0.359	0.083	-0.591	-0.099
LEA	0.031	0.265	0.135	0.374	1.003
STFL	0.021	0.040	0.146	0.380	0.370

Variable contributions to factors

Name	Factor 1	Factor 2
h	0.059	0.030
l	0.013	0.275
m	0.019	0.001
ns	0.238	0.021
Y1	0.055	0.046
Y2	0.087	0.003
Y3	0.000	0.050
LOT	0.035	0.055
TG	0.000	0.098
VEN	0.222	0.068
C1	0.001	0.015
C2	0.052	0.082
C3	0.028	0.000
A	0.001	0.022
S	0.001	0.022
10CM	0.082	0.098
FLO	0.085	0.003
LEA	0.013	0.101
STFL	0.009	0.009

Variable squared correlations with factors

Name	Factor 1	Factor 2
h	0.203	0.093
l	0.030	0.587
m	0.058	0.003
ns	0.577	0.047
Y1	0.201	0.152
Y2	0.260	0.008
Y3	0.001	0.125
LOT	0.128	0.184
TG	0.000	0.365
VEN	0.484	0.136
C1	0.005	0.115
C2	0.123	0.175
C3	0.065	0.001
A	0.003	0.083
S	0.003	0.083
10CM	0.207	0.225
FLO	0.349	0.010
LEA	0.032	0.232
STFL	0.021	0.020

Case coordinates

Name	Factor 1	Factor 2
1	0.446	0.350
2	0.185	1.152
3	0.195	0.107
4	0.224	-0.065
5	0.701	-0.398
6	0.784	-0.656
7	0.376	0.186
8	0.680	0.343
9	0.262	-0.133
10	0.568	-0.165
11	-0.219	0.022
12	-0.796	-0.275

13	-0.219	0.022
14	-0.190	-0.150
15	-0.728	1.041
16	-0.136	0.293
17	0.394	-0.655
18	0.423	-0.827
19	-0.045	-0.389
20	-0.016	-0.562
21	0.082	-0.225
22	0.440	-0.153
23	-1.588	-0.711
24	-1.560	-0.883
25	-0.047	1.296
26	-0.392	0.369
27	0.187	0.477
28	0.269	0.219
29	0.469	-0.254
30	0.552	-0.512
31	-0.478	1.030
32	-0.822	0.103

## **CHAPITRE 3**

## Variability of the *in vitro* AH activity of sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) related to different varieties

### Introduction

Gastrointestinal nematodes (GIN) had been classified as a major health and welfare problem in small ruminants (Wolstenholme et al, 2004). Such parasites impair animal health and productivity since GIN infections provoke poor growth and reproduction losses, consequently economical losses to the farmers (Sykes, 1994). Over the past decades, the control of these worms has been based on the constant use of chemical anthelmintics. However the widespread diffusion of anthelmintic (AH) resistance within worm populations, the restriction of anti-parasitic chemical molecules in lactating animals as well as the increasing concern of consumers for drug residues in food, have motivated investigation into alternative approaches (Waller, 1999). In the past decade, evidence has been accumulating indicating that some bioactive plants, rich in plant secondary metabolites (PSMs), represent a promising option to reduce the impact of these parasitic infections in small ruminants.

So far the majority of the *in vitro* and *in vivo* experiments with sheep and goats have focused on temperate tanniniferous fodder legumes (Fabaceae family) including sulla (*Hedysarum coronarium*) (Niezen et al, 2002), sericea lespedeza (*Sericea cuneata*) (Shaik et al, 2006), birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) (Marley et al, 2003) and sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) (Paolini, PhD Thesis, 2004; Heckendorn PhD Thesis, 2007; Brunet PhD Thesis, 2008), suggested that these plants have some AH properties affecting the biology of gastrointestinal parasites. These AH effects have mainly been attributed to condensed tannins (CTs) (Marley et al, 2003; Hoste et al, 2006). However, recent studies have indicated the possible implication of some other polyphenols, especially flavonols (Barrau et al, 2005; Ademola et al, 2005), or flavan-3-ols (Molan et al, 2003; Brunet and Hoste, 2006, Brunet et al, 2008) in the AH properties of these plants.

Sainfoin is a forage which contains CTs and other phenolic compounds (Lu et al, 2000; Marais et al, 2000; Regos and Treutter, 2010) whose AH activity has been confirmed *in vitro* (Paolini et al, 2004; Brunet et al, 2007; Manolaraki et al, 2010) and *in vivo* (Thamsborg et al, 2003; Paolini et al, 2003 and 2005; Hoste et al, 2005; Heckendorn et al, 2006 and 2007; Manolaraki et al, 2010).

Although there are other studies that have shown no significant effect of sainfoin against the GIN of ruminants (Athanasiadou et al, 2005; Paolini et al, 2005b). The current information illustrate the occurrence of a variability in results, which has been related to factors

depending on the parasite (stage, species), the host (sheep, goats, cattles) and/or the plant (species, variety, stage of growth) factors (Hoste et al, 2006).

In the current study our main objective was to examine how genetic factors influence the diversity of sainfoin samples in the AH activity. Our second objective was to evaluate how these factors are related to the quantitative and qualitative differences in some potential active compounds.

## **Materials and Methods**

### **• Sainfoin samples and preparation of extracts**

Forty different sainfoin varieties were selected according to their agronomical characteristics by NIAB (National Institute of Agricultural Botany), cultivated in Cambridge and collected from the field in summer 2008. All the plant samples were lyophilized, grounded (to 1mm in size) and either extracted in methanol:water (80:20) (Technical University of Munich) or in acetone:water (70:30) (Chemistry and Biochemistry laboratory of Reading). 38 methanolic and 14 acetonic extracts of sainfoin varieties were provided to us by these two laboratories. The two methanolic extracts missing compared to the NIAB accessions were due to the insufficient quantity of plant material for extraction. The 14 acetonic extracts were selected, among the 40 varieties, because of their biochemical characteristics.

### **• *In vitro* assay on AH activity**

The larval exsheathment inhibition assay (LEIA) was performed as described by Bahuaud et al, (2006) and was used to compare the inhibitory effects of the 52 sainfoin extracts (methanolic and acetonic) on third stage larvae (L3s) of *H. contortus*. The L3s were obtained by the Baerman's technique from fresh faeces collected from donor goats monospecifically infected with *H. contortus* (MAFF, 1986). The larvae were then stored at 4°C before use. One thousand 3-month-old ensheathed L3s incubated for 3h at 20°C either with four different concentrations (1200, 600, 300, 150 of extract kg/ml) of each plant extract diluted in phosphate buffer saline solution (PBS: 0,1M phosphate, 0,05M NaCl, pH 7,2) or with PBS (used as a negative control). Thereafter the L3s were washed and centrifuged three times in PBS. Then, they were submitted to the artificial process of exsheathment by contact with a solution of sodium hypochlorite (2% w/v) and sodium chloride (16,5% w/v) diluted in 1 to 300 in PBS. Four replicates were included for each plant concentration as well as for the negative control. The kinetics of L3 exsheathment, according to the different treatments, was identified

under microscopic observation at a magnification of x 200 at 0, 20, 40 and 60 min after contact with the solution to induce the artificial exsheathment.

### **Evaluation of tannin content in the samples**

#### **• Biological activity**

The biological activity of the plant samples, related to the tannin content was measured using the Radial Diffusion Method (Hagerman et al, 1978), which is based on the property of tannins to form complexes with proteins. We used Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich Ltd) as protein source and tannic acid (Sigma Ltd) as a standard. The results were expressed in gr-equivalents of Tannic acid/100 gr of dry plant (DP)

#### **• Folin-Ciocalteu assay**

The Folin Ciocalteu method (Makkar 2003) was used to determine the total polyphenols (TPs) and total tannins (TTs) in the extracts. After the initial measurements of TPs, PVPP (Sigma Aldrich Ltd) was added to the extract then TTs was calculated as the difference between TPs measured with or without addition of PVPP in the same extract. The TPs and TTs were determined by recording the absorbance at 725 nm using of a spectrophotometer (UV-Visible Spectronic Unicam, Genesys 8). A tannic acid standard curve was performed and the results were expressed as Tannic acid equivalents.

#### **• High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of phenolic compounds**

The quantification of phenolic compounds of the 38 methanolic extracts was performed using the HPLC method with diode array detection (DAD) and post-column derivatization with p-dimethyl-aminocinnamic aldehyde (DMACA) as described by Treutter, (1994) and Regos and Treutter, (2010) and were conducted in the Technical University of Munich. More precisely information were provided to us concerning the flavan-3ols, flavonols, flavones, anthocyanidins, cinnamic acids, arbutin as well as other minor compounds.

## • Tannin analyses

For the acetonic extracts of 14 sainfoin varieties, the tannins were analysed by direct thiolysis of freeze-dried samples with benzyl mercaptan at 40°C for 1 h to obtain quantitative and qualitative information on tannins (Gea et al, 2011). These analyses were conducted in the Chemistry and Biochemistry laboratory in Reading and they provided us quantitative data refer to the content of acetone:water (7:3 v/v) extractable CT, whereas qualitative data provide information on tannin structures, such as, mean degree of polymerisation (mDP) (i.e, molecular size), prodelphinidin(PD):procyanidin (PC) and cis:trans ratios.

## Statistical analyses

The statistical comparisons to control values in mean of the exsheathment rates, based on the results of the four replicates and depending on two factors, i.e. the larvae treatment and time, were assessed through the general linear model (GLM) procedure using Systat 9 software (SPSS Ltd.). Pearson's correlations were performed to calculate the coefficient of correlation between the inhibition values in LEIA measured after 60 minutes and the different biochemical compounds and measurements performed for both the methanolic (df = 36) and the acetonic extracts (df = 12)

In addition, two multivariate analysis (Principal Component Analyses) (PCA) were performed using the Systat 9 software (SPSS Ltd.) to obtain a synthetic description of the relationships between the effects of the extracts tested on larval exsheathment of *H.contortus* and their biochemical characteristics associated either with the phenolic compounds or with total phenols, total tannins as well as with mDP, cis:trans, PD:PC ratio.

## Results

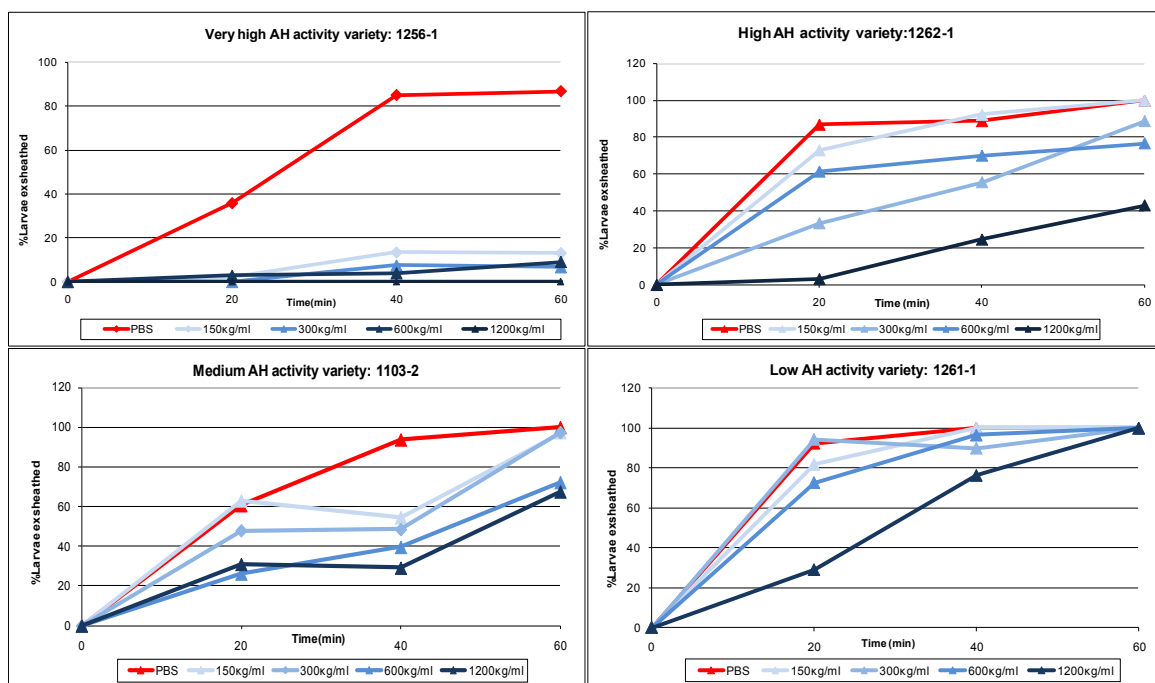
### • *In vitro* anthelmintic activity of the 38 methanolic extracts

In controls, > 98% ( $\pm 5,79$ ) of the *H.contortus* larvae was exsheathed after 60 min of contact with the solution for artificial exsheathment. Nine out of 38 methanolic extracts tested did show a significant delay, higher than 50%, in the exsheathment rate of *H.contortus* larvae. The methanolic extracts tested can be classified in four different groups according to their ability to inhibit the L3s exsheathment. For 7 out of the 38 sainfoin extracts, the inhibition activity ranged from 100 to 80% (very high), for 2 out of 38, it ranged from 79 to 50 % (high), for 7



out of 38, from 49 to 30% (medium) and for 22 out of 38, from 29 to 0% (low) (see table 1). These results referred to data obtained at the highest concentration tested (1200 kg/ml).

**Figure 1. Effect of four different methanolic sainfain extracts belonging in four different inhibition activity groups (very high, high, medium, low), on the process of artificial exsheathment of *H. contortus* infective stage larvae.**



The calculation of correlations coefficients between the inhibition values and the general characterization of the samples did not show significant values for the TT and TP. In contrast, significant and positive values were obtained with the NTT ( $r= 0,386$ ,  $df=34$ ,  $P <0,05$ ) and with the values of BA measured according to the radial diffusion method ( $r= 0,539$ ,  $df=34$ ,  $P <0,01$ ).

Similarly, coefficients of correlations have been calculated for the different categories of phenols measured in the sample. They were found to be significantly and positively associated with the total flavan-3ols, total anthocyanidin, total flavonols, cinnamic and coumaric acids, ( $P <0,01$ ) but not with flavones, arbutin and caffeic acid. A summary of the  $r$  values and significance is provided in table 2.

**Table 1. Classification of the methanolic extracts of 38 accessions varieties in four different groups according to their ability to inhibit larval exsheathment**

<b>Methanolic extracted varieties</b>			
<b>Breeding code</b>	<b>Variety</b>	<b>%inhibition 600µg/ml</b>	<b>%inhibition 1200µg/ml</b>
<b>Group 1</b>			
1256-1	wkt10	90	100
1165-2	reesA	75	100
1169-2	CPI 63810	91	97
1197-2	CPI 63838	94	96
1200	CPI 63841	14	93
1043	Bivolari	29	87
1179-1	CPI 63820	17	86
<b>Group 2</b>			
1163-2	Giant	48	76
1262-1	Cotswold Common	23	57
<b>Group 3</b>			
1026-2	Buciansky	5	40
1013-2	Somborne	16	35
1103-2	Korunga	28	33
1157-2	Miatiletka	0	31
1199	CPI 63840	10	31
1071	Hampshire	29	31
1230	Visnovsky	3	30
<b>Group 4</b>			
1253-2	Tu86-43-03	0	28
1210	Premier	0	22
1113-2	CPI 63753	27	14
1264-2	Sisiani Local	9	22
1001-2	Cotswold Common	5	27
1017-R1	Teruel	4	16
1019-2	Taja	12	21
1156-2	Dukorastushchii	3	11
1220-2	247	0	14
1123-2	CPI 63763	0	11
1012-2	Ambra	4	10
1211-1	Perly	0	9
1260-2	X93234	0	8
1213	CPI 63854	0	6
1110	CPI 63750	0	6
1077-2	NOVA	0	5
1028-1	Simpro	3	4
1041-2	Camaras	0	3
1005-2	PERLY	0	0
1007-2	COUNTRY:CHINA	0	0
1104-2	ORIGIN: TURKEY	0	0
1261-1	Line 107	0	0

**Table 2. The relationship between AH activity of sainfoin, measured through the inhibition of exsheathment at 60 minutes at the 1200 µg/ml and flavanol-3-ols and other phenolic compounds present in the samples**

Flavan-3ols (df=35)		Other phenolic compounds (df=34)	
Catechin: C	(NS)	Total flavonols	0,419 (P<0,01)
Epicatechin: EC	(NS)	Total Proanthocyanidins	0,44 (P<0,01)
Gallocatechin: GC	0,411 (P<0,01)	Total Anthocyanidins	0,480 (P<0,01)
Epigallocatechin:EGC	(NS)	Total flavones	(NS)
Sum: C-EC	0,403 (P<0,01)	Cinnamic acids	0,427 (P<0,01)
Sum: GC-EGC	0,350 (P<0,05)	Arbutin	(NS)
Total flavan-3ols	0,499 (P<0,01)	Caffeic acid glucoside	(NS)
		Coumaric acid	0,482 (P<0,01)

A first Principal Component Analysis (PCA) was performed to examine the relationships between the inhibition of the larvae exsheathment measured at 1200 µg/ml and the different measurements of the various phenols (Figure 2) (see Annex A) Examination of the plane obtained from axis 1 and 2, which represented 66% of the variability confirmed a close relationship between the AH activity and most of the phenolic compounds present in the extracts.

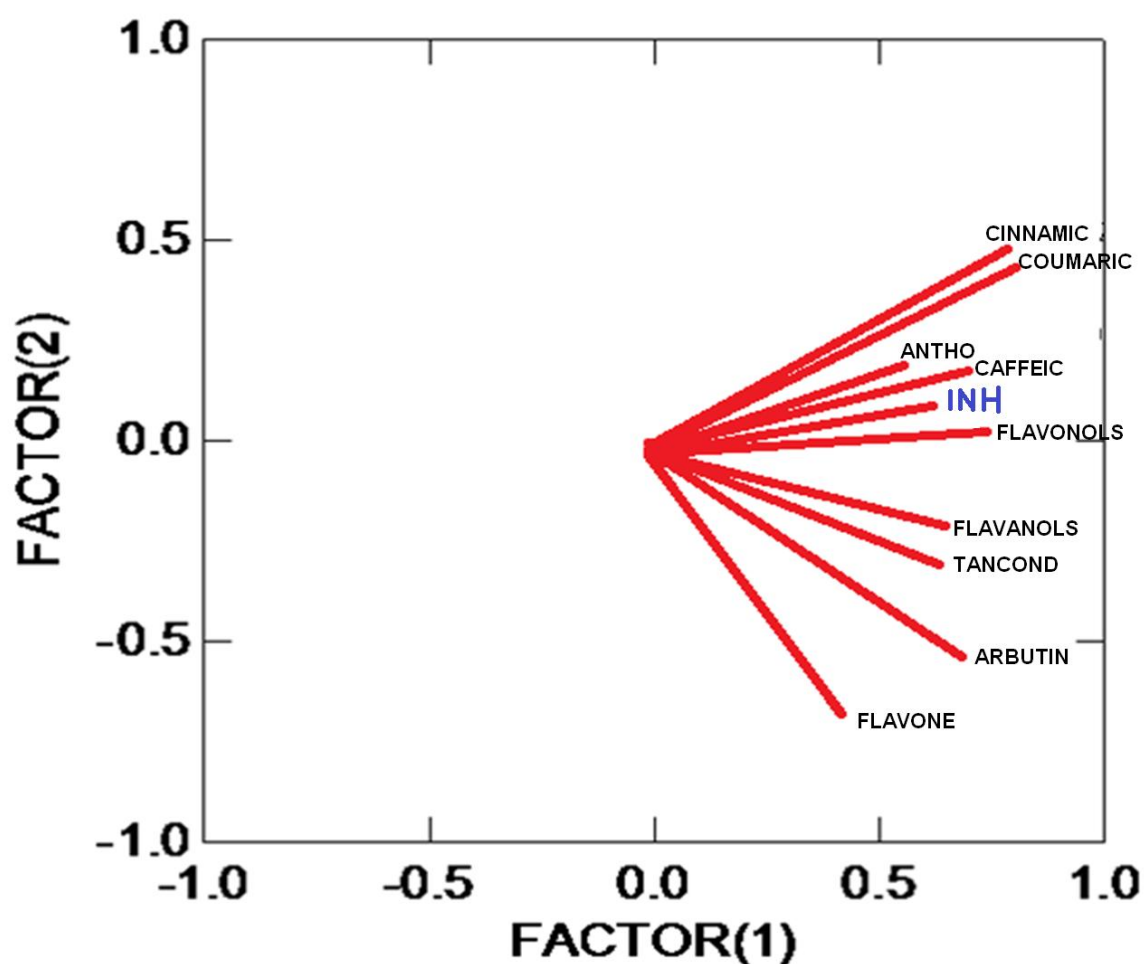
#### • *In vitro* anthelmintic activity of the 14 acetonic extracts

In the controls, on average, 100% of the *H.contortus* larvae were exsheathed after 60 min of contact with the solution for exsheathment. According to the results of the LEIA the inhibition activity of the larvae exsheathment ranged from 82% to 0%. Based on these, the extracts were classified into 4 different groups related to the AH activity. Two extracts have shown very high ( $\geq 80\%$ ) 4 high (79-50%), 3 medium (49-30%), and 5 low (29-0%), AH activity out of the 14 acetonic sainfoin extracts (see Table 3).

Calculation of the correlation coefficients showed a significant relation between the AH activity measured at the 2 highest doses used (1200 and 600µg/ml) (P<0,01). Moreover a significant positive correlation (P<0,01) was found between the inhibition of the larval exsheathment and the biological activity, as measured by the radial diffusion, of the samples. In contrast, the AH activity was not significantly related to any biochemical measurements of tannin or phenols (TT, TP, NTT)

When similar correlations were calculated with the measurements which characterized the quality/nature of tannins, again no significant correlation was found with the purity/quantity of

Figure 2. Principal plane of overall relationships obtained from the Principal Component Analyses (PCA) applied with results of the following variables: total soluble proanthocyanidins (TANCOND), total flavanol (FLAVANOLS), anthocyanidins (ANTHO), total flavonols (FLAVONOLS), total flavone (FLAVONE), total cinnamic acids (CINNAMIC), p-coumaric acid (COUMARIC), arbutin (ARBUTIN) and caffeic acid (CAFFEIC), and the values of the exsheathment inhibition (INH) at 1200 $\mu$ g/ml. The analyses variability is 68%.



tannins present in the extracts. The only significant correlation was negative ( $r = -0,563$ ,  $P < 0,05$ ) indicated that the samples with the highest mDP coincided with the lowest percentage of inhibition.

In addition, significant and positive relationships were found between the trans value, the PD values, the mDP values and the total tannin content measured by the coefficient of purity. However, these variables, except mDP did not appear to be significantly related to the AH activity.

**Table 3. Classification of the acetonc extracts of 14 accessions varieties in different groups according to their ability to inhibit larvae exsheathment.**

Acetonc extracted varieties			
Breeding code	Variety	% Inhibition 600 $\mu$ g/ml	% Inhibition 1200 $\mu$ g/ml
<b>Group 1: Very high</b>			
1163	Giant	12	82
1220	247	28	80
<b>Group 2: High</b>			
1071	Hampshire	13	72
1123	CPI63763	80	68
1262	Cotswold	53	59
1179r1	CPI63820	5	57
<b>Group 3: Medium</b>			
1261r1	Line 107	0	48
1165r1	ReesA	0	32
1110	CPI 63750	0	31
<b>Group 4: Low</b>			
1113	CPI63753	0	16
1127	CPI 63767	3	5
1077	Nova	0	4
1264r1	Sisiani Local	0	2
1103	Korunga	0	0

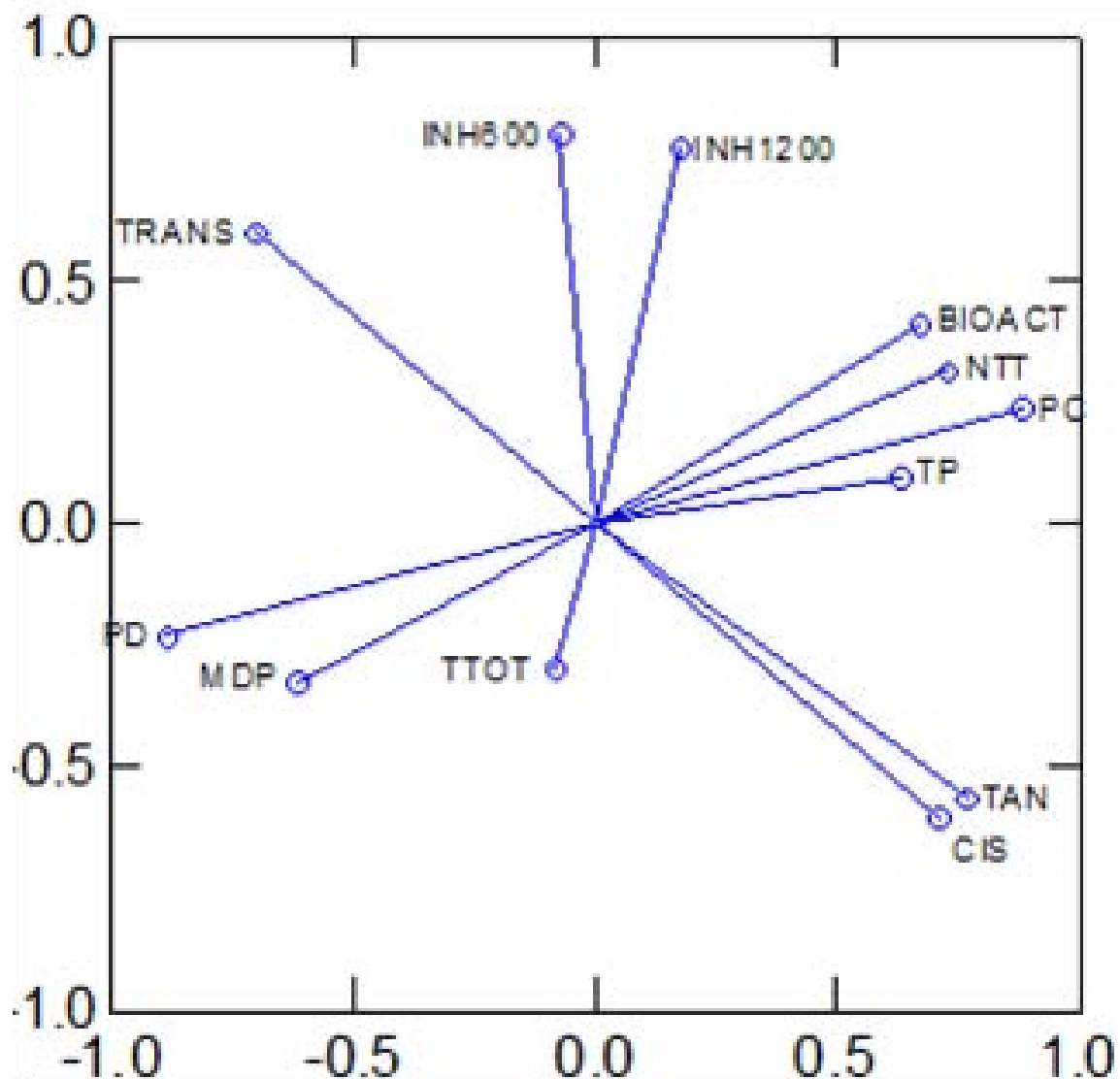
#### • Principal Component Analysis concerning the acetonc extracts

An overview of the relationship between the antiparasitic effects of the acetonc extracts measured *in vitro* and the biochemical characteristics of tannins, both through quantitative and qualitative (such as mDP, cis-trans and PD:PC ratios) measurements has been obtained

through a PCA (Figure 3) (Annex B). When combined Axis 1 and 2 represented nearly 90% of the total variance. The overall analyses of multicorrelation confirmed the results of the 2 by 2 analyses

On the plane, the variables Inhib1200 and Inhib600 were close to the RD variable and the PC values but opposite to the PD, total tannin and mDP variable (Figure 3).

**Figure 3. Principal plane of overall relationships obtained from the Principal Component Analyses (PCA) between the following variables: total phenols (TP), non total tannins (NTT) total tannins (TTOT), radial diffusion values (BIOACT), mean degree of polymerisation (MDP), prodelphinidin (PD), procyanidin (PC), cis (CIS), trans (TRANS) and the purity of tannin (TAN) and the values of the exsheathment inhibition at 1200 $\mu$ g/ml (INH1200) and 600 $\mu$ g/ml (INH600). The analyses variability is 65%.**



### • Comparison of methanolic vs acetonic extracts

In order to examine the possible relationships between the methanolic and acetonic extracts, correlations were calculated between the inhibition values measured at the same concentration (600 or 1200 µg/ml) for the two modes of extractions. For both concentration, they were non significant (df=12).

In addition, a comparison of the correspondance between varieties with inhibitory activities over 50% depending the 2 processes of extraction indicated that only 3 varieties were common (Table 4).

**Table 4. Comparison between the methanolic and acetonic extracted varieties showing the exsheathment inhibition (>50%).**

<b>Varieties with &gt;50% inhibition activity</b>			
<b>Methanolic extracts</b>		<b>Acetonic extracts</b>	
Breeding code	Variety	Breeding code	Variety
1179-1	CPI 63820	1179-1	CPI63820
1163-2	Giant	1163	Giant
1262-1	Cotswold Common	1262	Cotswold Common
1256-1	wkt10	1220	247
1165-2	reesA	1071	Hampshire
1169-2	CPI 63810	1123	CPI63763
1197-2	CPI 63838		
1200	CPI 63841		
1043	Bivolari		

### Discussion

The main objectives of this study were defined in order to evaluate the effect of possible genetic factors on the AH activity of sainfoin and secondly to explore how these variations relate to quantitative and /or qualitative changes in phenolic compounds like CTs, flavanols or flavonols. To our knowledge, this is the first study which examined different sainfoin varieties for their AH activity.

All the sainfoin varieties tested were selected from the same area (Cambridge NIAB) and at the same moment in order to reduce as much as possible the influence of other environmental factors as illustrated in chapter 2. Despite these cautions, it has to be underlined that minor differences might have occurred in the growth stage of sainfoin varieties collected at the same date. Our overall results confirmed the existence of a variability related to the varieties since only 9 out of the 38 methanolic and 6 out of the 14 acetonic extracted

varieties have shown an inhibitory effect over 50% on the larval exsheathment of *H. contortus*.

The possible relationships and concordance between the active methanolic and acetic extracts were examined. Firstly, no statistical correlations were found between the inhibitory values measured at 600 and 1200 µg/ml for both types of extracts. Secondly, only 3 varieties showed a concordant classification depending on the mode of extraction. A possible explanation of these divergent results depending on the solvent used, is that the methanolic procedure extract preferentially phenolic compounds with small molecular weight (MW) compared to the water:acetone solution which favoured the bigger molecules.

With regard to the methanolic extracts, the AH activity, measured by LEIA was found to be significantly and positively correlated with the NTT and the BA values but not with the TP and TT values. These results tend to confirm that the role of phenolic molecules, differing from tannins, was worth to be more closely investigated in relation with the AH activity.

This was performed both by calculations of Pearson's coefficient correlations between two separate measurements and by the realization of a Principal Component Analysis in order to analyse the overall correlations between the 10 variables assessed. Results of both mode of analysis were overall consistent, suggesting that, for these methanolic extracts, the AH activity of sainfoin might relate to the total flavan-3ols, total anthocyanidins, total flavonols, but also to some other small phenolic compounds such as the cinammic and coumaric acids.

The antiparasitic effects of pure flavan-3ols, such as catechin, epicatechin, galocatechin, epigallocatechin, galloyl derivatives, has been previously mentioned and discussed depending on the biochemical structure of the monomers (Molan et al, 2003, Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al, 2008). The possible involvement of flavonols has also been evoked in an early study on sainfoin (Barrau et al, 2005) or on other legume forages (Ademola et al, 2005). It is worth to underline that the role of these compounds have also been found from the results obtained in chapter 2 of this thesis, as well as the possible relationship with hydroxycinnamic acids.

The influence of genetic factors in the CTs content among different varieties of Fabaceae species has been demonstrated in several studies e.g. either on *Hedysarum coronarium* (Piluzza et al, 2000), or on various *Lotus species* (Aerts et al, 1999; Marley et al, 2006; Acuna et al, 2008), on *Flemingia macrophylla* (Jackson and Barry, 1996), *Vicia faba* (Wang and Ueberschar, 1990) or *Chamaecytisus palmensis* (Assefa et al, 2008). Moreover, the influence of the cultivar on the tannin characteristics concerning the composition of flavan-3ols, the PD:PC ratios, the mean degree of polymerisation, the molecular weight of polymers



was studied in *Lotus spp* (Mueller Harvey, 2006; Meagher et al, 2004; Hedqvist et al, 2000). Because of the main role of tannic compounds suspected in the AH activity (Hoste et al, 2006, Mueller Harvey et al, 2006), differences in the tannin profiles of 14 acetonic extracts were also examined because the use of a mixture of acetone: water (70:30) is more prone to promote the extraction of tannins and high MW molecules than the methanol extraction.

The calculation of correlation coefficients between the inhibitory effects of the extracts and different general biochemical measurements have shown that the AH effects were positively correlated with the biological activity of the plants, as measured by the radial diffusion. In contrast the AH activity was not significantly related to any biochemical measurements of tannin or phenols (TT, TP, NTT). A similar tendency was observed from the results of the PCA analysis. These results suggest that methods to measure the ability of tannins to complex proteins (European Pharmacopea, 2001) like the radial diffusion method (Makkar, 2003) or the method of the European Pharmacopea on skin powder (2001), despite several criticisms, might be better indicators of the AH activity than pure biochemical methods like the Folin Ciocalteu or the HCl Butanol methods (Makkar, 2003)

In general, the relationship between the inhibitory effect obtained from LEIA and different measurements characterizing the tannins present in the acetonic extracts were also found non significant with the exception of the degree of polymerization (mDP). The lower mDP values coincided with the higher exsheathment inhibition suggesting that tannins of small size are more active than the larger ones. No significant correlations were found between the AH activity and PD:PC trans-cis or total tannins measurements.

The results of the PCA suggest that the AH activity was more related to non tannin products than to tannins which is consistent with the previous observations made on the methanolic extracts. In this analysis, the AH activity appeared also more related to procyanidins than to prodelphinidins. This last observation is in contrast with previous results indicating that prodelphinidin monomers were characterised by higher AH activity than procyanidin ones (Molan et al, 2003, Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al, 2008). This apparent discrepancy could be explained by special property of sainfoin in relation with the stereochemical structure of its tannins. The possible occurrence of confounding effects is illustrated by significant positive correlations measured between PDs, mDP and total tannins values. This means that, in sainfoin, prodelphinidins coincided with higher MW and with a lower binding capacity of the molecules. These observations but also the fact that tannins with lower values of mDP seemed more effective against parasites strengthen the hypothesis that the structure of tannins influence their AH activity. This was suggested first by Brunet and Hoste, (2006) who have shown that the number of free hydroxyl groups of CT monomers modulate the

affinity of tannins for proteins (Bruneton, 1999; Mueller-Harvey, 2006), and the interactions with the proteins of the nematode sheath.

However, these results on the acetonic extracts should be considered only as indicative because of the small number of samples which have been examined. Analyses of additional samples are required to strengthen these first conclusions. Similarly, the respective roles of condensed tannins, flavanols, flavonols and other phenolic compounds need further evaluation. Such information will help to develop a successful breeding programme for sainfoin variety with potential anthelmintic benefits.

## References

- Acuña, H., Concha, A., Figueroa, M., 2008. Condensed tannin concentrations of three *Lotus* species grown in different environments. *Chilean Journal of Agriculture Research* 68, 31-41.
- Ademola, I.O., Akanbi, I.A., Idowu, O.S., 2005. Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharmaceutical Biology* 43, 599-604.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 75, 1-12.
- Assefa, G., Sonder, K., Wink, M., Kijora, C., Steinmueller, N., Peters, K.J., 2008. Effect of variety and harvesting management on the concentration of tannins and alkaloids in tagasaste (*Chamaecytisus palmensis*). *Animal Feed Science and Technology* 144, 242-256.
- Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Veterinary Parasitology* 127, 233-243.
- 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., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Brunet, S., 2008. Analyse des mecanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphenoliques sur les nematodes du tube digestif des ruminants. Doctorat de l'Universite de Toulouse, France (p 246).
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008. 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.
- Bruneton, J., 1999. Tannins. In: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes medicinales*, TEC&DOC (Ed), Paris, pp. 369-404.
- Gea, A., Stringano, E., Brown, R.H., Mueller-Harvey, I., 2011. *In situ* analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high throughput germplasm screening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59, 495-503.

- Hagerman, E.A., Butler, G.L., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 809–812.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* 142, 293-300.
- Heckendorn, F., 2007. The control of gastrointestinal sheep nematodes with tanniferous forage plants. PhD Thesis of Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Suisse (p 73).
- Heckendorn, F., Haring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology* 146, 123-134.
- Hedqvist, H., Mueller-Harvey, I., Reed, J.D., Krueger, C.G., Murphy, M., 2000. Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology* 87, 41-56.
- Hoste, H., Gaillard, L., Le Frileux, Y., 2005. Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats. *Small Ruminant Research* 59, 265-271.
- 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.
- Jackson, S.F., Barry, T.N., 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 103-110.
- Lu, Y., Sun, Y., Foo, L.Y., McNabb, W.C., Molan, A.L., 2000. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry* 55, 67-75.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), 1986. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Makkar, H.P., 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. In: A Laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy (FAO / IAEA), Vienna, Austria, pp. 49-53.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 685-696.
- Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Ferreira, D., 2000. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3440-3447.
- Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J., Lampkin, N.H., 2003. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Veterinary Parasitology* 112, 147-155.

- Marley, C.L., Fychan, R., Jones, R., 2006. Yield, persistency and chemical composition of *Lotus* species and varieties (birdsfoot trefoil and greater birdsfoot trefoil) when harvested for silage in the UK. *Grass and Forage Science* 61, 134-145.
- Meagher, L.P., Lane, G., Sivakumaran, S., Tavendale, M.H., Fraser, K., 2004. Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry. *Animal Feed Science and Technology* 117, 151-163.
- 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 of Parasitology* 33, 1691-1698.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2010-2037.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Robertson, H.A., Shelton, I.D., Waghorn, G., 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
- Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Research* 34, 331-339.
- Paolini, V., 2004. Effets des tanins condensés sur le parasitisme par les nematodes gastro-intestinaux chez la chevre. Doctorat de l'Universite de Perpignan, France (p 146).
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, 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.
- Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005a. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 127, 277-283.
- Paolini, V., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005b. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *The Veterinary Journal* 170, 260-263.
- Pharmacopée-Européenne 2001. Déterminations des tannins dans les drogues vegetales. 3ème Edition du conseil de l'Europe.
- Piluzza, G., Bullitta, S., Deroma, M., Odoardi, M., 2000. The accumulation of condensed tannins in local populations of sulla. *CIHEAM-Options Mediterraneennes* 45, 199-202.
- Regos, I., Treutter, D., 2010. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Chromatography* 1217, 6169-6177.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology* 139, 150-157.

- Sykes, A.R., 1994. Parasitism and production in farm animals. *Animal Production* 59, 155-172.
- Thamsborg, S.M., Mejer, H., Bandier, M., Larsen, M., 2003. Influence of different forages on gastrointestinal nematode infections in grazing lambs. In, *The 19th International Conferences of WAAVP*, New Orleans, USA, pp. 189.
- Treutter, D., Santos-Buelga, C., Gutmann, M., Kolodziej, H., 1994. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *Journal of Chromatography* 667, 290-297.
- Waller, P.J., 1999. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology* 29, 155-164.
- Wang, P.X., Ueberschär, K.H., 1990. The estimation of vicine, convicine and condensed tannins in 22 varieties of fababeans (*Vicia faba L.*). *Animal Feed Science and Technology* 31, 157-165.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G.V., Sangster, N.C., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20, 469-476.

## ANNEXE

## A. Analysis of 38 methanolic extracts by Principal Component Analyses

Latent Roots (Eigenvalues)

	1	2	3	4	5
	5.366	1.251	0.869	0.770	0.562
	6	7	8	9	10
	0.543	0.355	0.151	0.087	0.045

Component loadings

	1	2
INHIB1200	0.616	0.067
TOTSOLPRO	0.828	-0.394
TOTFLAVANOL	0.881	-0.305
ANTHOCYANID	0.857	0.246
TOTFLAVONOLS	0.719	0.011
TOFLAVONE	0.376	-0.518
TOTACCINMIC	0.800	0.474
PCOUMARICACI	0.790	0.493
ARBUTIN	0.621	-0.446
CAFFEICACID	0.695	0.055

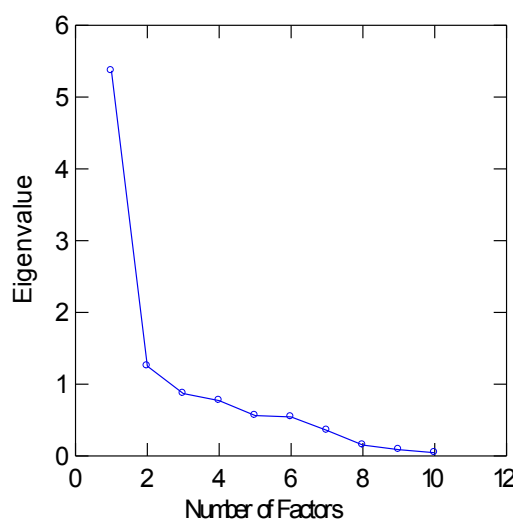
Variance Explained by Components

	1	2
	5.366	1.251

Percent of Total Variance Explained

	1	2
	53.658	12.511

Scree Plot





## B. Analysis of acetic extracts by Principal Component Analyses

Latent Roots (Eigenvalues)

1	2	3	4	5
4.960	2.860	1.773	1.026	0.596
6	7	8	9	10
0.360	0.213	0.141	0.069	0.000
11	12			
0.000	0.000			

Component loadings

	1	2
ACETINH120	0.171	0.770
ACETINH60	-0.074	0.799
TP	0.633	0.097
NTT	0.732	0.316
TTOTAUX	-0.087	-0.300
RDVALUES	0.674	0.412
MDP	-0.619	-0.324
PD2	-0.884	-0.234
PC2	0.884	0.234
CIS2	0.706	-0.601
TRANS2	-0.706	0.601
TANINIMH	0.765	-0.569

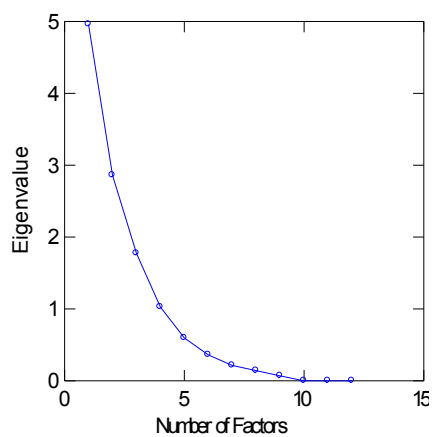
Variance Explained by Components

1	2
4.960	2.860

Percent of Total Variance Explained

1	2
41.337	23.834

Scree Plot



## CHAPITRE 4

## Compared in vitro anthelmintic activity of different conservation methods of sainfoin (fresh, hay, silage): Possible role of flavonoid glycosides and aglycones

### Introduction

Over the past 50 years, the control of GIN infections has been achieved mainly through intensive chemoprophylaxis, based on the repeated use of commercial anthelmintic (AH) drugs. However, this quasi exclusive reliance on synthetic drugs appears not sustainable and is now encountering severe limitations. The main threat to the use of synthetic AHs to control gastro-intestinal nematodes comes from the worms themselves. Parasitic worms are able to develop resistance to AH drugs relatively rapidly once commercialised (Waller, 2006) and AH resistances within worm populations are now a worldwide phenomenon (Kaplan, 2004). The occurrence in some regions of multiresistant strains exacerbates the situation (Kaplan, 2004). Hence, the control of these parasitic nematodes with AHs alone is nowadays severely challenged. This explains the strong impetus given to current researches on alternative approaches to synthetic drugs (Krecek and Waller, 2006, Waller and Thamsborg, 2004). Among these novel approaches, some recent results indicate that the use of nutraceuticals, especially bioactive plants rich in condensed tannins (CT) and other polyphenols, might represent a valuable alternative option for the control of gastrointestinal nematodes (Hoste et al, 2006; Mueller-Harvey 2006; Rochfort et al, 2008).

Several circumstantial evidence, obtained with a range of tanniniferous legume forages, e.g. sulla (*Hedysarum coronarium*), birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), maku (*Lotus pedunculatus*), or *Sericea lespedeza*, suggest that these plants possess some anthelmintic properties affecting the biology of parasitic nematodes of the gastro intestinal tract. These AH effects are mainly attributed to the high content of CT (Kahn and Diaz-Hernandez, 2000; Niezen et al., 1998a,b, 1995; Marley et al., 2003; Min et al., 2003b; Hoste et al., 2006). However, recent evidence also indicated that other polyphenolic compounds, such as flavonoid glycosides can play a role in the AH activity (Barrau et al., 2005; Ademola et al., 2005). This has been partly confirmed through *in vitro* studies where the activity against trichostrongyles of extracted CT or monomeric units of these polyphenolic compounds has been examined (Molan et al., 2000, 2003, Brunet and Hoste, 2006).

Sainfoin (*Onobrychis viciifoliae*) is another legume forage which contains tannins and also other phenolic compounds, such as flavonoid glycosides (Bate-Smith, 1973; Borreani et al., 2003, Lu et al., 2000; Marais et al., 2000). Its AH activity against third stage infective larvae

or adult worms has been confirmed both in sheep (Heckendorn et al, 2006, 2007; Rios de Alvarez et al, 2008, Athanasiadou et al, 2005) and in goats (Paolini et al, 2003, 2005). Depending on the studies, these results have been obtained with different forms of sainfoin : fresh, hay, pellets or as silage (Heckendorn et al, 2006, 2007). However, no study has compared the efficacy against nematodes depending on the form of preservation.

Therefore, this trial was designed firstly to evaluate the potential influence of methods of conservation (fresh, hay or silage), on the AH activity of sainfoin measured in *in vitro* conditions. Then, a second assay was designed to test the hypothesis that the differences observed according to the form of conservation might be due to some differences in the nature of the flavonoid compounds, in particular in the ratio between of the flavonol glycosides and aglycones. Therefore, the AH activity of 3 flavonols (quercetin, kaempferol, isorhamnetin) and of the dihydrochalcone phloretin were compared to respective glycoside molecules.

## Materials and Methods

### • *Haemonchus contortus* larvae

Infective, third-stage larvae of *H. contortus* were obtained by larval culture from the faeces of purely infected donor goats. The cultures were performed at 22°C and the larvae were harvested by the Baerman's technique. After collection, the larvae were stored at 4°C during four months before being used in the Larval Exsheathment test. Before use, the larval viability was verified under the stereomicroscope and their concentration adjusted to 1000 L3 per ml.

### • Larval exsheathment inhibition assay

The artificial larval exsheathment inhibition assay (LEI) was performed, as previously described (Jackson and Hoste, 2010), in order to compare the inhibitory effects of the various sainfoin samples (experiment 1) and/or pure flavonoid compounds (experiment 2) on the exsheathment of *H. contortus* larvae. One ml of larval suspension (1000 L3/ml) were distributed in 5 Eppendorf tubes, containing respectively 1ml of PBS (negative control) (PBS, BioMerieux®) or of an increasing gradient of concentration to be tested diluted in PBS. The use of PBS aimed at avoiding interference with any non-specific effect due to pH change. All incubations were carried out for 3 h at 20°C. Thereafter, the L3 were washed with PBS and centrifuged (3500 rpm) three times. The larvae were then submitted to the artificial process of

exsheathment by contact with a solution of sodium hypochlorite (2% w/v) and sodium chloride (16,5% w/v) diluted in 1 to 300 in PBS, pH 7,2. The kinetics of larval exsheathment according to the various experimental treatments, was then measured by microscopic observation and identification of exsheathed vs ensheathed larvae at a magnification of x 200 by regular examination at 0, 20, 40, and 60 minutes after contact with the hypochlorite solution. Four replicates were run per sample and concentration.

#### • **Biological activity**

The biological activity of the plant samples, related to the tannin content was measured using the Radial Diffusion Method (Hagerman and Butler, 1978), which is based on the property of tannins to form complexes with proteins. We used Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma Aldrich Ltd) as protein source and tannic acid (Sigma Ltd) as a standard. The diffusion of tannin content in the petri dishes agar embedded with BSA leads to the formation of a precipitation ring. The results were expressed in gr-equivalents of Tannic acid/100 gr of dry plant (DP). The Protein Precipitating Activity (PPA) is estimated by the diameter of the precipitation ring and is calculated according to the formula:  $PPA = [(D^2 - d^2) \times (\text{Vol. Extr.} / \text{Vol. Depos.})] / (m)$  [D: Diameter of ring (mm), d: diameter of well (mm), Vol. Extr: Vol. of acetone 70% for extraction (κl), Vol. Depos.: Vol. deposited in the well (κl), m: Mass of plant utilized for extraction (gr)]

#### • **Sainfoin extracts (Experiment 1)**

Sainfoin samples of 2 varieties (Ambra and Sepial) were collected in 2 places (Realville and Blars), characterized by different soil pH on 3 different occasions and 2 different stages (25/06/07 and 10/05/07). These samples were submitted to three processes of conservation, fresh, hay and silage. A fresh lucerne sample was included as a negative control because lucerne is a legume forage without tannins. Eventually, 17 sainfoin samples and one lucerne samples were examined for their possible AH activity.

The extract used for our experiment, obtained after shaking of five grams of dried powder of each plant in an acetone:water (70:30) solution for 1h at <50°C. The filtrate was concentrated under low pressure at 40°C and then washed 3 times with 50 ml dichloromethane to remove chlorophyll and lipids. Following freeze drying for 24h, a powder of plant extract was eventually obtained and subsequently kept at 4°C until use. For the sainfoin extracts, the

concentrations tested in the LEI assay were eventually: 150, 300, 600 and 1200  $\mu\text{g}$  extract/ml of PBS.

### • Pure chemical flavonoid compounds (Experiment 2)

Three flavonol aglycones (quercetin, kaempferol, isorhamnetin) and the dihydrochalcone phloretin were compared to their respective glycoside molecules (see Table 1). For these pure biochemical compounds, the differences in molecular weight was taken into account to define the gradient of concentrations to be tested which relied on molar values, i.e. at were defined by taking into account on between compounds. The tested concentrations were therefore: 0.000125, 0.00025, 0.0005 and 0.001 M plus a PBS (negative control) according to the procedure described for the extract, i.e. 4 replicates per compound and time of observation, same timing interval.

**Table 1. Flavonols and dihydrochalcone examined in the study**

Compounds	Number of OH groups	Number of glycoside radicals	Molecular Weight
Quercetin	5	0	302,2
Quercetin 3-O-glucoside (isoquercitin)	8	1	464,4
Quercetin 3-O-glucorhamnoside (rutin)	10	2	610,5
Quercetin 3-O-glucorhamnoside-7-rhamnoside	12	3	792,5
Kaempferol	4	0	286,2
Kaempferol 3-O-rhamnoglucoside	9	2	600,0
Isorhamnetin	4	0	316,3
Isorhamnetin 3-O-glucorhamnoside (narcisin)	9	2	624,6
Phloretin	4	0	274,3
Phloretin 2'-glucoside (phloridzin)	7	1	436,4

### Statistical analyses

In both experiments, the statistical comparisons of differences in mean of the exsheathment rates based on the results from the four replicates, depending on treatment (sainfoin samples or pure biochemical compounds) and time were assessed using a general linear model (GLM) procedure using the Systat 9 software (SPSS Ltd).

In addition, multivariate analyses were performed using the Systat 9 software (SPSS Ltd) to obtain a synthetic description of the relationships between the effects on larval exsheathment and the characteristics of either the sainfoin samples in experiment 1 [multiple

correspondence analysis (MCA)] of the chemical structures (glycoside or aglycone) and doses in experiment 2 [principal component analyses (PCA)].

The variables composing the column of the matrix used for the MCA performed for the analysis on the sainfoin samples included the site of collection (Blars or Realville), the date of collection (25/06/07 and 10/06/07), the variety (Ambra and Sepial), the conservation method (fresh, hay, silage) and the measured effects on the larval exsheathment at the 2 highest concentrations (600 and 1200 µg/ml).

The variables included in the matrix for the pure biochemical flavonoids included, the total number of free OH groups, the number of carbohydrate molecules, the molecular weight and the value of the inhibitory effects measured on the larval exsheathment at the different molar concentration (0,000125; 0,00025; 0,0005 and 0,001 M)

## Results

### • Experiment 1. Effect of the various methods of conservation of sainfoin on the artificial exsheathment of *H.contortus*

The mean values obtained after 60 minutes for the exsheathment rates of *Haemonchus* larvae in the control PBS was 97,7%. An example of the statistical analysis of the effects of treatment and concentration revealed a significant effect for 11 out of the 17 samples. In most cases, this was a dose dependent effect. As expected, the effects of the negative control, lucerne, was non significant. From these 11 positive extracts, 5 have been obtained from hay, 4 from silage and 2 from fresh samples. As a consequence, the mean inhibition values after 60 minutes was 34,8% for the 6 fresh samples when the values were respectively 78,5 and 72,8 for hay and silage.

### Multifactorial analysis (MCA)

The results of the Multifactorial correspondence analysis (MCA) showed that exist a strong relationship between the high/very high values of inhibition and the silage or hay. The absence or the lower inhibition effects were positively related to fresh type samples and the Lucerne samples. Sepial variety was more in proximity with the higher inhibition values than the Ambra.



Figure 1. Example of the *in vitro* inhibitory effects of silage extracts on the larval exsheathment of *Haemonchus contortus* (Ambra variety of sainfoin, collected in Blars on the 25th June 2007)

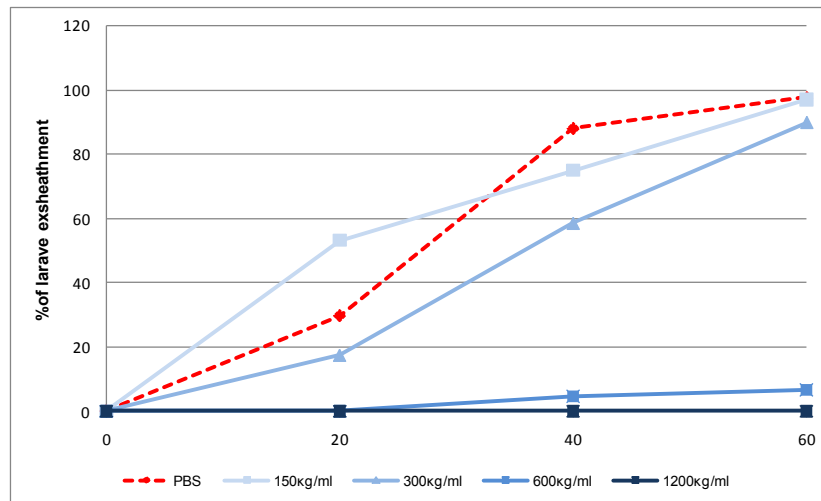
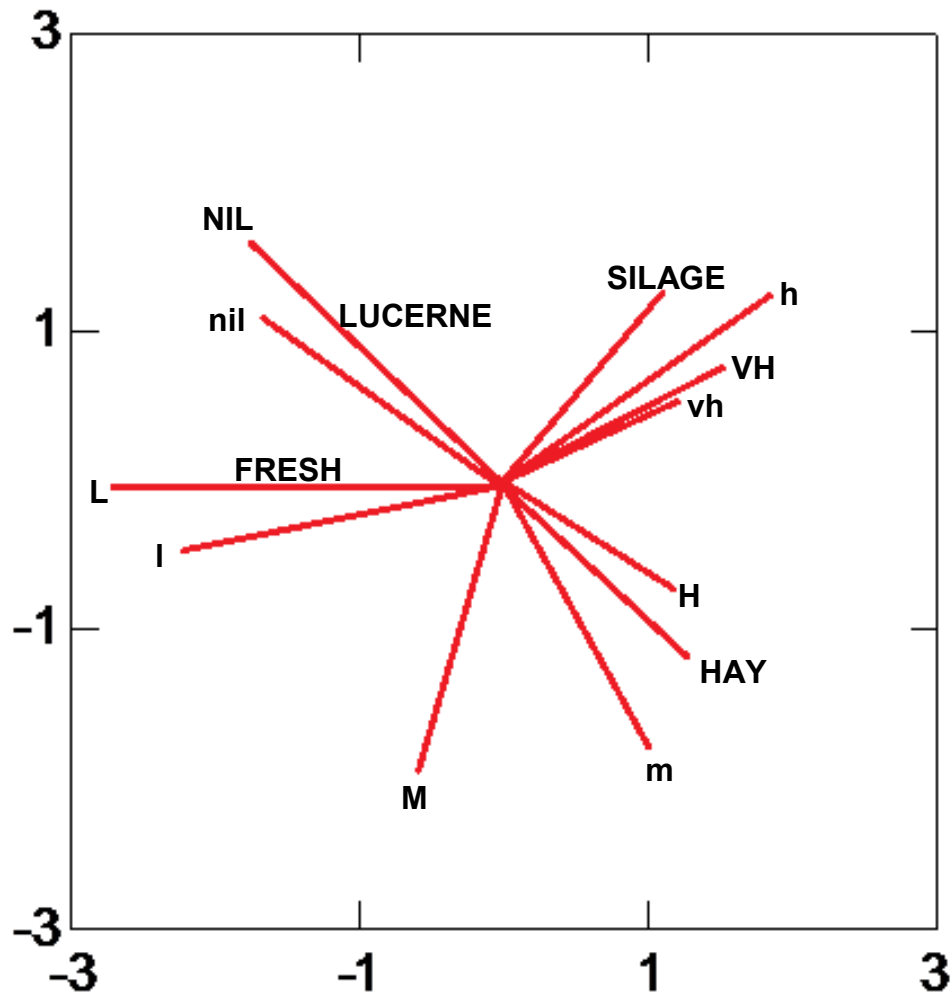


Table 2. Percentage of reduction of larval exsheathment at 150, 300, 600 and 1200µg/ml concentration for the different extracts of fresh, hay and silage sainfoin.

SAMPLE	RD value	150	300	600	1200	Stat	Stat
						trt	dose
Lucerne Realville 10/06/08	1,16	0	0	0	0	NS	NS
Blars 10/05/07 Ambra fresh	1,84	0	4	0	3,8	NS	NS
Blars 10/05/07 Ambra hay	1,46	0	3	33,5	57,8	P<0,05	NS
Blars 10/05/07 Ambra silage	1,37	0	0	3	7,4	NS	NS
Blars 10/05/07 Sepial fresh	1,47	0	4	11,6	16,4	NS	NS
Blars 10/05/07 Sepial hay	1,36	0	2	48,8	100	P<0,01	P<0,01
Blars 10/05/07 Sepial silage	1,57	0	13	69,6	97,6	P<0,01	P<0,01
Blars 25/06/07 Ambra fresh	1,6	0	2	3,1	39,6	NS	NS
Blars 25/06/07 Ambra hay	0,63	0	6	22,9	35,3	NS	NS
Blars 25/06/07 Ambra silage	1,19	0	8	93,2	100	P<0,01	P<0,01
Blars 25/06/07 Sepial fresh	1,8	0	4	41	90,6	P<0,01	P<0,01
Blars 25/06/07 Sepial hay	1,26	0	0	1,3	79,7	P<0,01	P<0,01
Blars 25/06/07 Sepial silage	1,5	0	8	70,3	97,4	P<0,01	P<0,01
Realville 24/05/07 Ambra fresh	2,09	0	0	14,2	48,6	P<0,01	P<0,01
Realville 24/05/07 Ambra hay	1,48	0	0	67,2	100	P<0,01	P<0,01
Realville 24/05/07 Sepial fresh	1,71	0	0	0	0	NS	NS
Realville 24/05/07 Sepial hay	1,38	0	10	66,9	100	P<0,01	P<0,01
Realville 24/05/07 Sepial	1,55	0	10	6,8	62,3	P<0,01	P<0,01

Figure 2. Principal plane describing the overall relationships obtained from the multivariate analysis (MCA) between the following variables: type (FRESH, HAY, SILAGE) and exsheathment inhibition of *H.contortus* at 1200 (NIL, L, M, H or VH) and 600 µg/ml (nil, l, m, h or vh). The analysis variability is 36%.

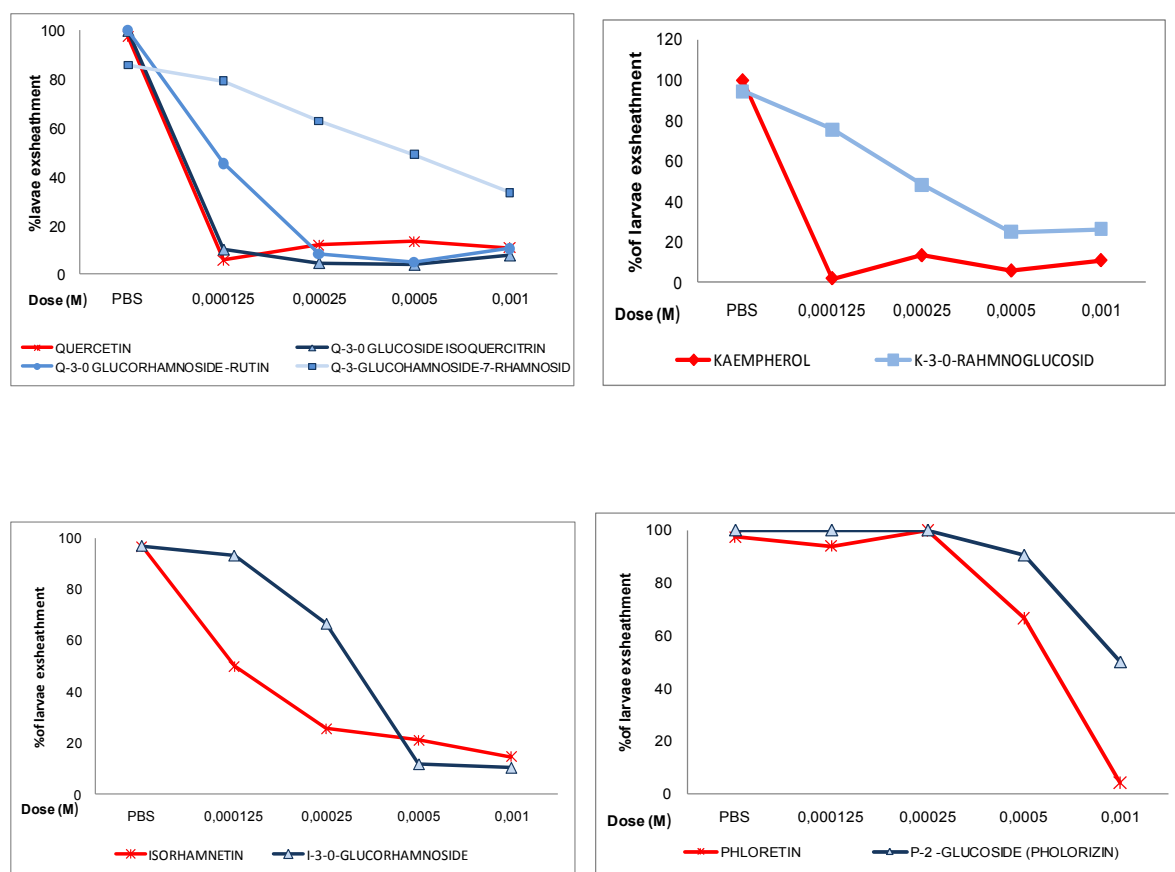


• **Experiment 2. Compared effects of pure flavonoids (glycoside and aglycone) on the artificial exsheathment of *H.contortus***

The anthelmintic activity of the 3 flavonol glycosides compared to the aglycone form as well as for the dihydrochalcone (phloridzin vs phloretin) is illustrated in figure 3. Statistical differences were detected between the glycoside vs aglycone molecules for the group of quercetin, ( $P=0,001$ ), kaempferol, ( $P=0,03$ ), and isorhamnetin, ( $P=0,04$ ) with the highest AH

activity being usually found for the aglycone molecules. In contrast, no differences were found between the dihydrochalcone phloretin and its glycoside form phloridzin (Table 3). A dose response effect was found for the isorhamnetin and phloridzin groups (Table 3).

**Figure 3. Compared inhibitory effects of the different pure flavonols or dihydrochalcone, glycoside and aglycone, on the larval exsheathment of *H.contortus* after 60 minutes.**



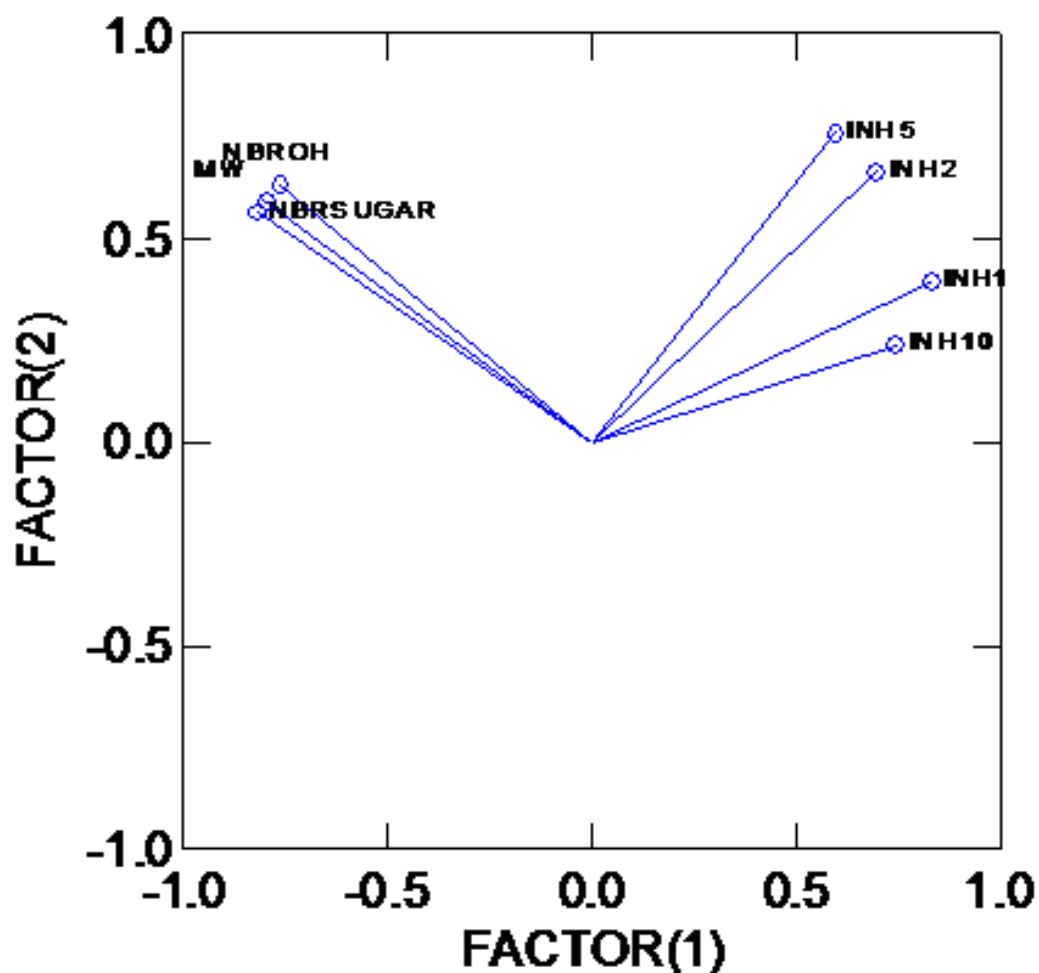
**Table 3. Statistical results of the effects of the various compounds and dose on the larval exsheathment of *H.contortus* with three flavonols group Quercetin (Qu), Kaempferol (K), Isorhamnetin (Is) and one dihydrochalcone, Phloridzin (PI)**

	Flavonols		Dihydrochalcone	
	Qu	K	Is	PI
Glycoside vs Aglycone	P=0,001	P=0,03	P=0,04	NS (P<0,1)
Dose effect	NS	NS	P=0,02	P=0,01

### Multifactorial analysis (PCA)

The results of the Principal Component Analysis (PCA) showed that exist a strong relationship between the different values of inhibition depending on the concentrations expressed as molar weight. On contrary, this inhibition seemed negatively related to 3 factors: the molecular weight, the number of sugar and the number of free OH groups which are closely related.

Figure 4. Principal plane of overall relationships obtained from Principal Component Analysis (PCA) between the following variables: anthelmintic activity (INH), characteristics of flavonols (MW, NBROH, NBR SUGAR) in the experiment 2. The analysis variability is 90%.



## Discussion

Data confirming the AH effects of sainfoin have been obtained in the two small ruminant species with various mode of preservation of this legume forage: i.e. either fresh (Heckendorn et al, 2006; 2007), hay (Scharenberg et al, 2008; Heckendorn et al, 2006; Paolini et al, 2003, 2005, Hoste et al, 2005; Valderabano et al, 2010) or silage (Heckendorn et al, 2006). Similarly, significant AH results have been obtained with *Sericea lespedeza*, with fresh (Min et al, 2004, 2005), hay (Shaik et al, 2004; 2006; Lange et al, 2006, Terrill et al, 2009) or pelleted forms (Terrill et al, 2007) as well as with cassava used either fresh or silage (Sokerya et al, 2009)

It is generally considered that the AH effects of tannin-containing forages are related to the content of condensed tannins (Hoste et al, 2006), although some *in vitro* results suggest that some other flavonoid molecules, e.g. flavonols or flavanols, might also possess some AH properties (Barrau et al, 2005; Brunet and Hoste, 2006; Molan et al, 2003, 2004). The dose dependent relationship between the concentration of tannins and/or flavonoid compounds and the AH activity has been repeatedly demonstrated both in *in vitro* (Brunet and Hoste, 2006; Molan et al, 2000, 2002) and in *in vivo* conditions (Min and Hart, 2003 ; Hoste et al, 2006, Brunet et al, 2007, Terrill et al, 2009). The current results underlined the variability in anthelmintic activity which has been observed between the samples depending on the site and/or date of collection related to the phenological stage of the plant. These results tend to confirm those of previous studies aiming at examining the variations in antiparasitic activity depending on the environmental conditions or cultivars (see Chapitre 2 and 3)

It is usually considered that technological processes aiming at the preservation of Legume forage such as drying to prepare hay, urea treatment (Vitti et al, 2005) or silaging contribute to change the binding of polyphenols to proteins (Grabber, 2009, Grabber and Coblenz, 2009) and/or to reduce the measured concentrations of various flavonoids, including tannins. For example, the measurements of CT in sainfoin was divided by five in hay compared to fresh samples (Aufrere et al, 2008). Similarly, in our study, in general, lower biological activities have been measured by the radial diffusion method in the samples corresponding to the preserved forms compared to the fresh ones, which is in agreement with most of the previous reports.

Based on *in vitro* studies, the aim of our first experiment was to compare the AH activity of samples representing the various mode of preservation, with the hypothesis that the lowest amount of CT in the preserved forms should be related with a lower activity. Paradoxically, in regard of antiparasitic properties, the comparison suggested overall a higher AH activity for the hay and the silage samples than for the fresh ones. This was confirmed by the statistical

comparisons of the mean percentage of larval exsheathment inhibition measured at 1200 µg/ml as well as by the results of the multivariate analysis. In *in vitro* conditions, the conserved forms seemed therefore more active than the fresh samples.

Based on these comparative results, we proposed the hypothesis that the highest overall activity of the conserved form might depend on the nature of the biochemical flavonoid compounds possibly involved in the AH properties of sainfoin. To explore this hypothesis represented the aim of our second experiment.

Previous studies have provided evidence suggesting that not only condensed tannins (Paolini et al, 2004; Hoste et al, 2006) but also the constitutive monomers (flavan-3-ols) (Brunet and Hoste 2006, Brunet et al, 2008) and some flavonols (Barrau et al, 2005) can also partly explain the antiparasitic activity. To take into account the differences in molecular weight between the tested compounds, the assays have been performed in relation with the molar concentrations of each compound. The AH effects measured for the different flavonoid compounds which have been selected in the current assay confirmed a possible role of these compounds as previously suggested (Barrau et al, 2005)

The different steps of the synthesis of the condensed tannins, which are polymers of flavan-3-ols include flavonoids of diverse families (Bruneton 1999; Halbwirth, 2010) and are usually present in the vacuoles of plant cells. The comparison of the anthelmintic activity of the aglycone vs the glycoside forms of different examples of flavonols and dihydrochalcone was issued from the hypothesis that the drying or silaging processes contribute to destroy the vacuoles and consequently, to favor the contact of glycoside forms with the cytoplasmic enzymes which will promote the liberation of aglycone forms (Mueller Harvey and Mc Allan, 1992). Overall, the results acquired with the flavonols tend to confirm this hypothesis since the aglycone forms of kaempferol, quercetin and isorhamnetin appeared more active than the glycoside ones. In contrast, for the two examples of dihydrochalcone, no difference was observed. The inhibition of larval exsheathment observed here with the flavonols confirmed the previous results acquired by Barrau et al in 2005 with another assay (LMIA). However, she only examined the effect of glycoside compounds, namely quercetin-3-rutinoside (rutin), kaempferol-3-rutinoside (nicotiflorin) and isorhamnetin-3-rutinoside (narcissin). Our current results suggest that rutin is in fact more active than the glycoside forms of isorhamnetin and kaempferol. On the other hand, the fact that the aglycone flavonols are more active than the dihydrochalcone (phloridzin) suggest that the presence of 3 heterocyclic structures is associated with higher AH properties of the compounds.

The results of the Principal Component analysis showed that many characteristics of the compounds which have been tested (MW, number of sugars number of hydroxyl groups) are

closely related. They correspond in fact to the glycoside forms. On the other hand, these chemical features are negatively related to the activity, this trend being even more evident when the PCA was restricted to the sole flavanols. In contrast, with flavan-3-ols, the presence of high number of hydroxyl groups and the higher MW related to gallates forms have been associated with higher activity (Brunet and Hoste, 2006)

In conclusion, the results of this study acquired in *in vitro* conditions suggest a higher activity of conserved forms of sainfoin compared to the fresh material. This has to be verified in *in vivo* conditions but has consequences on the choice of material to promote in farm conditions. Evidence has been obtained to support the hypothesis that this can be due to the presence of aglycone forms of flavonols in silage and hay. These results confirmed that other flavonoids than condensed tannins contribute to the AH activity of TR Legumes. They also underline the need of further studies to better understand the relationship between the biochemical structure of the flavonoids and their AH properties



## References

- Ademola, I.O., Akanbi, I.A., Idowu, O.S., 2005. Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharmaceutical Biology* 43, 599-604.
- Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Veterinary Parasitology* 127, 233-243.
- Aufrere, J., Dudilieu, M., Poncet, C., 2008. *In vivo* and *in situ* measurements of the digestive characteristics of sainfoin in comparison with lucerne fed to sheep as fresh forages at two growth stages and as hay. *animal*, 1331-1339.
- 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 flavonoid glycosides. *Parasitology* 131, 531-538.
- Bate-Smith, E., 1973. Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* 12, 1809-1812.
- Borreani, G., Peiretti, P.G., Tabacco, E., 2003. Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) in the spring growth cycle. *Agronomy* 23, 193-201.
- 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., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134, 1253-1262.
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008. 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.
- Bruneton, J., 1999. Tannins. In: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales.*, TEC&DOC, Paris, pp. 369-404.
- Grabber, J.H., 2009. Protein fractions in forage legumes containing protein-binding polyphenols: Freeze-drying vs. conservation as hay or silage. *Animal Feed Science and Technology* 151, 324-329.
- Grabber, J.H., Coblenz, W.K., 2009. Polyphenol, Conditioning, and conservation effects on protein fractions and degradability in forage legumes. *Crop Science* 49, 1511-1522.
- Hagerman, E.A., Butler, G.L., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 809-812.
- Halbwirth, H., 2010. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 595-621.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of

- Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* 142, 293-300.
- Heckendorn, F., Haring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology* 146, 123-134.
- Hoste, H., Gaillard, L., Le Frileux, Y., 2005. Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats. *Small Ruminant Research* 59, 265-271.
- 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.
- Jackson, F., Hoste, H., 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes, In : *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, 2010. pp. 25-45.
- Kahn, L.P., Diaz-Hernandez, A., 2000. Tannins with anthelmintic properties. In: Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR proceeding n.92 International workshop, (Brooker, ed.), Adelaide.
- Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report *Trends in Parasitology* 20, 477-481
- Krecek, R.C., Waller, P.J., 2006. Towards the implementation of the "basket of options" approach to helminth parasite control of livestock: Emphasis on the tropics/subtropics. *Veterinary Parasitology* 139, 270-282.
- Lange, K.C., Olcott, D.D., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H., Burke, J.M., Kearney, M.T., 2006. Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Veterinary Parasitology* 141, 273-278.
- Lu, Y., Sun, Y., Foo, L.Y., McNabb, W.C., Molan, A.L., 2000. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry* 55, 67-75.
- Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Ferreira, D., 2000. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3440-3447.
- Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J., Lampkin, N.H., 2003. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Veterinary Parasitology* 112, 147-155.
- 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., Hart, S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science* 81, 102-109.

- Min, B.R., Pomroy, W.E., Hart, S.P., Sahlu, T., 2004. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Ruminant Research* 51, 279-283.
- Min, B.R., Hart, S.P., Miller, D., Tomita, G.M., Loetz, E., Sahlu, T., 2005. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Veterinary Parasitology* 130, 105-113.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., Min, B.R., McNabb, W.C., 2000. The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitology (Praha)* 47, 39-44.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., McNabb, W.C., 2002. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Veterinary Record* 150, 65-69.
- 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 of Parasitology* 33, 1691-1698.
- Molan, A.L., Sivakumaran, S., Spencer, P.A., Meagher, L.P., 2004. Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Research in Veterinary Science* 77, 239-243.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology* 1, 151-217.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2010 - 2037.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A., Waghorn, G.C., 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *Journal of Agricultural Science* 125, 281-289.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G., Charleston, W.A., 1998a. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Veterinary Parasitology* 80, 15-27.
- Niezen, J.H., Waghorn, G., Charleston, W.A., 1998b. Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed *Lotus (L.pedunculatus)* or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Veterinary Parasitology* 78, 13-21.
- Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Veterinary Record* 152, 600-601.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, 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.
- Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 127, 277-283.

- Rios-de Alvarez, L., Greer, A.W., Jackson, F., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J.F., 2008. The effect of dietary sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology* 135, 1117-1124.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R., 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69, 299-322.
- Scharenberg, A., Heckendorn, F., Arrigo, Y., Hertzberg, H., Gutzwiller, A., Hess, D.H., Kreuzer, M., Dohme, F., 2008. Nitrogen and mineral balance of lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and fed tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Animal Science* 86, 1879-1890.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, D., Kouakou, B., Kamman, G., Kallu, R.K., Mosjidis, J., 2004. Effects of feeding sericea lespedeza hay to goats infected with *Haemonchus contortus*. *South African Journal of Animal Science* 34, 234-237.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology* 139, 150-157.
- Sokerya, S., Waller, P.J., Try, P., Hoglund, J., 2009. The effect of long-term feeding of fresh and ensiled cassava (*Manihot esculenta*) foliage on gastrointestinal nematode infections in goats. *Tropical Animal Health and Production* 41, 251-258.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Veterinary Parasitology* 146, 117-122.
- Terrill, T.H., Dykes, G.S., Shaik, S.A., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2009. Efficacy of *sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats: Dose titration study. *Veterinary Parasitology* 163, 52-56.
- Valderrábano, J., Calvete, C., Uriarte, J., 2010. Effect of feeding bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb faeces. *Veterinary Parasitology* 172, 89-94.
- Vitti, D.M.S.S., Nozella, E.F., Abdalla, A.L., Bueno, I.C.S., Filho, J.C.S., Costa, C., Bueno, M.S., Longo, C., Vieira, M.E.Q., Filho, S.L.S.C., Godoy, P.B., Mueller-Harvey, I., 2005. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. *Animal Feed Science and Technology* 122, 123-133.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004. Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology* 20, 493-497.
- Waller, P.J., 2006. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology* 126, 277-289

**ANNEXE****A. DATA USED ON THE ANALYSES MCA (MULTIFACTORIAL CORRESPONDANCE ANALYSIS) in the experiment 1**

Categorical values encountered during processing are:

PLANTE\$ (3 levels)

AMB, LUZ, SEP

TYPE\$ (3 levels)

FRESH, HAY, SIL

REDC120\$ (5 levels)

H, L, M, NIL, VH

RED60\$ (6 levels)

high, low, med, medium, nil, veryhigh

## Multiple Correspondence Analysis

Factor	Eigenvalue	Percent	Cum Pct	
1	0.673	20.72	20.72	-----
2	0.485	14.92	35.64	-----
3	0.417	12.84	48.47	-----
4	0.372	11.45	59.92	-----
5	0.339	10.42	70.35	-----
6	0.283	8.72	79.07	---
7	0.212	6.52	85.59	--
8	0.181	5.58	91.16	--
9	0.167	5.13	96.30	--
10	0.068	2.10	98.40	
11	0.031	.97	99.37	
12	0.017	.53	99.90	
13	0.003	.10	100.00	

Sum 3.250 (Total Inertia)

## Variable Coordinates

Name	Mass	Quality	Inertia	Factor 1	Factor 2
AMB	0.118	0.485	0.132	-0.055	-0.737
LUZ	0.015	0.340	0.235	-2.086	1.045
SEP	0.118	0.415	0.132	0.316	0.606
FRESH	0.103	0.684	0.147	-0.988	0.035
HAY	0.074	0.500	0.176	0.851	-0.689
SIL	0.074	0.289	0.176	0.533	0.640
H	0.029	0.038	0.221	0.366	-0.388
L	0.044	0.142	0.206	-0.815	0.022
M	0.044	0.613	0.206	-0.436	-1.634
NIL	0.029	0.564	0.221	-1.721	1.127
VH	0.103	0.758	0.147	0.923	0.480
high	0.059	0.546	0.191	1.086	0.772
low	0.088	0.388	0.162	-0.823	-0.181
med	0.029	0.041	0.221	0.417	-0.369
medium	0.029	0.338	0.221	0.723	-1.417
nil	0.029	0.255	0.221	-1.256	0.579
veryhigh	0.015	0.053	0.235	0.828	0.408

## Variable contributions to factors

Name	Factor 1	Factor 2
AMB	0.001	0.132
LUZ	0.095	0.033

SEP	0.017	0.089
FRESH	0.149	0.000
HAY	0.079	0.072
SIL	0.031	0.062
H	0.006	0.009
L	0.044	0.000
M	0.012	0.243
NIL	0.129	0.077
VH	0.130	0.049
high	0.103	0.072
low	0.089	0.006
med	0.008	0.008
medium	0.023	0.122
nil	0.069	0.020
veryhigh	0.015	0.005

## Variable squared correlations with factors

Name	Factor 1	Factor 2
AMB	0.003	0.482
LUZ	0.272	0.068
SEP	0.089	0.326
FRESH	0.684	0.001
HAY	0.302	0.198
SIL	0.118	0.171
H	0.018	0.020
L	0.142	0.000
M	0.041	0.572
NIL	0.395	0.169
VH	0.597	0.161
high	0.363	0.183
low	0.370	0.018
med	0.023	0.018
medium	0.070	0.268
nil	0.210	0.045
veryhigh	0.043	0.010

## Case coordinates

Name	Factor 1	Factor 2
1	-1.712	0.727
2	-0.702	-0.903
3	0.330	-1.607
4	0.679	0.284
5	0.204	0.270
6	0.871	0.897
7	-0.949	-0.036
8	0.481	-0.783
9	-0.354	-0.092
10	0.871	0.897
11	-0.704	0.173
12	0.857	-0.366
13	0.855	-0.062
14	-0.702	-0.903
15	0.119	0.244
16	-1.112	0.843
17	0.968	0.419

**B. DATA USED ON THE ANALYSES PCA (PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS) in the experiment 2**

Component loadings

	1	2
INH1	0.829	0.392
INH2	0.697	0.663
INH5	0.596	0.761
INH10	0.744	0.241
MW	-0.802	0.593
NBROH	-0.765	0.629
NBRSUGAR	-0.823	0.563

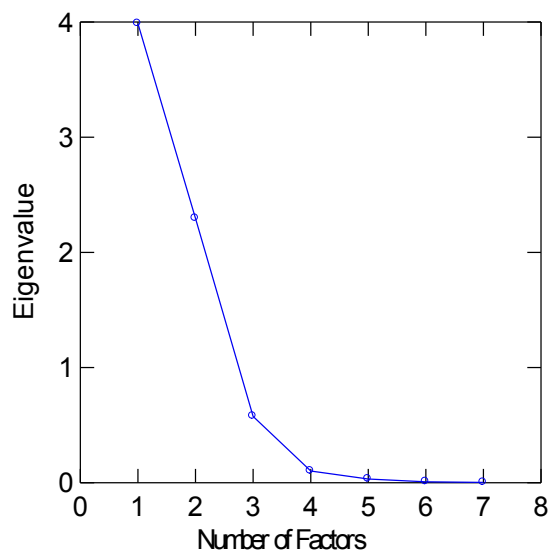
Variance Explained by Components

1	2
3.987	2.295

Percent of Total Variance Explained

1	2
56.955	32.784

Scree Plot





## **DISCUSSION GENERALE**

### • Critique de la méthodologie employée

Compte-tenu des objectifs de cette thèse, les méthodes *in vitro* sont apparues les plus adaptées pour cribler le grand nombre d'échantillons prévus dans les diverses parties. Examiner les propriétés d'autant d'échantillons sur animaux, y compris sur modèle murin éventuel, comme suggéré dans certaines publications (Rojas et al, 2006) paraît à la fois éthiquement et économiquement peu acceptable. Par ailleurs, ces méthodes *in vitro* ont aussi l'avantage de permettre une analyse des composés impliqués plus aisée que dans le cas d'études *in vivo* où une métabolisation des molécules en fonction des conditions rencontrées dans les divers organes digestifs est à envisager. Pour prendre l'exemple des tannins, il est suspecté que selon le pH local et donc l'organe impliqué, les complexes tannins-protéines seraient plus ou moins stables (Ramirez Restrepo et Barry, 2005; Mueller Harvey, 2006), influant ainsi potentiellement sur leur disponibilité et l'activité sur les vers (Hoste et al, 2006).

Ce choix de privilégier des méthodes *in vitro* comme outil principal d'étude a supposé de prendre certaines précautions pour faciliter leur interprétation au regard des conditions *in vivo*. En particulier, du PBS a été utilisé pour éviter tout effet non spécifique dû à des variations de pH. Par ailleurs, les concentrations appliquées pour incuber les larves *in vitro*, correspondent à celles employées lors de précédents essais (Brunet et al, 2007, 2008; Paolini et al., 2004), qui paraissent correspondre aux teneurs présentes *in vivo* dans la lumière digestive. Molan et al, (2000b, 2004), citant une étude de Terril et al (1994), ont en effet signalé que les concentrations de tanins totaux dans la caillette et le duodénum de moutons nourris par un régime riche en tanins variaient entre 1100 à 2800 µg/ml, avec des équivalences de concentrations en tanins extractibles de l'ordre de 350 à 900 µg/ml. Au vu de ces données, les gradients de concentrations (de 150 à 1200 µg/ml) appliqués dans nos essais peuvent être considérés comme étant physiologiquement significatifs.

De nombreuses méthodes *in vitro* ont été développées pour étudier les effets antiparasitaires d'anthelminthiques chimiques ou pour évaluer la résistance aux anthelminthiques d'isolats de parasites (Johansen, 1989). Elles ont été adaptées pour vérifier l'efficacité d'extraits de plantes ou de métabolites secondaires (tannins) purifiés (Jackson et Hoste, 2010). Ces méthodes ont pour objet soit les œufs de nématodes (test d'inhibition d'éclosion des œufs = EHA : Egg Hatch Assay) (Coles et al, 1977; Hunt et Taylor, 1989; Le Jambre et al, 1976) ou test de développement larvaire = LDA) (Coles et al, 1977; Hubert et Kerboeuf, 1992; Taylor, 1990), soit les stades larvaires L1 et L2 (Inhibition de la nutrition larvaire = LFIA, (Alvarez-Sanchez et al, 2005; Geary et al, 1993), soit les larves infestantes de troisième stade (L3), (Inhibition de migration larvaire = LMIA) (Rabel et al, 1994; Barrau et al, 2005) ou (Inhibition

du dégagement larvaire=LEIA) (Bahuaud et al, 2006), soit les vers adultes (Inhibition de mobilité des adultes = AMIA) (O'Grady et Kotze, 2004; Paolini et al, 2004).

Dans les deux premiers chapitres de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser la méthode d'inhibition de migration larvaire (LMIA) pour mesurer l'activité AH. Le principe du test est fondé sur la capacité des différents composés actifs à paralyser les larves infestantes et à inhiber en conséquence leur migration à travers un tamis dont la taille des pores suppose un processus actif de la part des L3. Les raisons de ce choix initial étaient la facilité d'application du LMIA, son emploi en routine non seulement dans le laboratoire d'accueil de la thèse depuis que les travaux sur les interactions entre tannins et nématodes constituent le thème de l'équipe (Paolini et al, 2004; Barrau et al, 2005; Alonso-Diaz et al, 2008a, b) mais aussi, plus largement, chez d'autres groupes travaillant sur des thématiques proches (ex Rabel et al, 1994 ; Molan et al, 2000a, b, 2004) ce qui facilitait la comparaison directe de nos résultats avec ceux publiés précédemment. Toutefois, des critiques sur le LMIA ont aussi été exprimées. D'une part, les difficultés de standardisation [Demeler et al, 2010 (in press)] conduisent à des questionnements sur sa reproductibilité d'un laboratoire à l'autre. D'autre part, un relatif manque de sensibilité conduit à des difficultés pour calculer des Doses Léthales ou Inhibitrices 50 (DL50 ou DI50) car des inhibitions supérieures de migration supérieures à 50% ont rarement été observées. Enfin une des hypothèses avancées pour expliquer l'incapacité des L3 à migrer serait liée à des troubles neurophysiologiques ou neuromusculaires, causés par des PSMs des plantes testés. Cependant, des interrogations demeurent sur le mode d'action suspecté *in vitro* et sa signification en conditions *in vivo*.

Pour les études des chapitres 3 et 4, la méthode d'inhibition du dégagement larvaire a donc plutôt été retenue. Il s'agit d'une méthode développée et standardisée initialement dans le laboratoire de l'UMR 1225 (Bahuaud et al, 2006, Brunet et Hoste, 2006) qui présente plusieurs intérêts par rapport au LMIA. Elle est plus simple de mise en œuvre, moins consommatrice de larves, plus reproductible d'un laboratoire à l'autre. Elle a surtout deux avantages: Le LEIA est plus sensible que le LMIA ce qui, pour des gammes identiques de concentrations testées, permet de calculer en général des DL50 (ou DI50) et fournit ainsi des informations utiles pour le calcul de doses minimales nécessaires pour observer les effets anthelminthiques *in vivo*. Par ailleurs, sans que le mécanisme d'action ait été clairement identifié, une étude a indiqué que l'inhibition du dégagement des L3s existe aussi en conditions *in vivo* et selon une relation dose-dépendante comme généralement décrit *in vitro* (Brunet et al, 2007). Peu d'études ont jusqu'à présent comparé les conclusions obtenues avec les deux essais, à l'exception d'un travail d'Alonso Diaz et al 2010, (soumis) montrant de manière générale une bonne concordance entre les résultats des deux tests, tout en soulignant la plus grande sensibilité du LEIA.

Il est évident que l'ensemble des arguments avancés pour justifier un large usage des méthodes *in vitro* dans cette thèse ne dispense pas de vérifier ensuite la validité des résultats obtenus *in vivo*, pour un nombre plus restreint d'échantillons discriminants. Cette démarche (criblage général *in vitro* / vérification *in vivo*) a d'ailleurs été illustrée dans le chapitre 1. Sa mise en œuvre est également prévue pour valider un certain nombre de résultats acquis sur la comparaison intra spécifique entre divers échantillons de sainfoin.

• **Etudes de la variabilité d'activité:**

De manière générale, l'ensemble de nos résultats ont confirmé à la fois la grande diversité des plantes pouvant potentiellement servir comme nutriments (Andlauer et Furst 2002; Waller et Thamsborg, 2004) mais aussi les multiples facteurs pouvant entraîner des variations d'activité antiparasitaire.

Les résultats constituant le corps du chapitre 1 ont illustré le nombre de plantes appartenant à diverses familles botaniques qui sont potentiellement dotées de propriétés anthelminthiques, en particulier lorsqu'un critère phytochimique (présence de tannins et de polyphénols) est utilisé comme critère initial de sélection. Dans le cas d'espèce (plantes des parcours méditerranéens), en conditions *in vitro*, 7 sur 8 des plantes retenues se sont avérées positives, et surtout des confirmations d'efficacité ont été acquises en conditions *in vivo* pour quatre d'entre elles. Parmi celles-ci, le sainfoin a été retenu comme modèle pour poursuivre les études sur la variabilité intraspécifique car **1)** il s'agissait d'une Légumineuse fourragère qui *a priori* était plus attractive pour être cultivée par des éleveurs, **2)** les possibilités de dissémination géographique paraissaient plus larges, **3)** des travaux antérieurs plus nombreux existaient sur la composition biochimique en PSMs de cette plante (Lu et al, 2000; Marais et al, 2000; Regos et Treutter, 2010) et **4)** au-delà des aspects antiparasitaires, l'exploitation de ce type de Légumineuses contenant des tannins suscite actuellement un intérêt renouvelé en raison du développement de problématiques émergentes sur les interactions entre nutrition animale et conséquences environnementales, sur l'adaptation des Légumineuses à des conditions climatiques changeantes voire sur la recherche de plantes mellifères.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'est effectué une telle série d'études (constituant les chapitres 2, 3 et 4 de cette thèse) sur l'analyse des facteurs modulant l'activité AH d'une Légumineuse contenant des tannins. La conclusion générale est que l'existence d'une extrême variabilité d'effet a été constatée, quelque soit le type de facteur

examiné (environnement de culture de la plante, génétique des variétés étudiées, traitement technologique appliqué).

Les résultats de l'étude portant sur les facteurs liés aux conditions de culture sont plutôt à considérer comme des indications, en raison de l'existence de plusieurs facteurs confondants entre certains échantillons prélevés. Beaucoup de ces données nécessitent une confirmation *in vivo*. Les résultats suggérant que les échantillons les plus actifs seraient 1) ceux obtenus en période automnale (dernier cycle de coupe) ou lors de l'année 3 du cycle de culture, et 2) ceux issus de région à pH basique (Causse du Lot) sont probablement les plus significatifs en terme d'exploitation en élevages. Ces différences pourraient être expliquées par les conséquences sur le développement de la plante de phénomènes comme les déficits en eau, les variations de température, la fertilité et le type de sol mais aussi les « agressions » répétées, tout facteurs de stress connus pour favoriser une augmentation des polyphénols et notamment des tannins dans les plantes (Feutch et al, 1997; Caygill et Mueller Harvey, 1999; Cadot et Minana Castello, 2006; Tiemann et al, 2010). Nos observations sont en accord avec les études antérieures qui ont montré l'influence de l'environnement sur la qualité et la quantité de tanins

Des études antérieures ont par ailleurs indiqué que le stade phénologique de la plante, en particulier la présence d'un fort pourcentage de feuilles et leur maturité, influence la quantité et la qualité des tannins. Les feuilles sont en effet les organes de la plante les plus riches en tannins. Des données indiquent également que le stade phénologique est lié à des variations du ratio PD : PC et que la valeur moyenne du degré de polymérisation augmente avec la maturité des feuilles (Koupais-Abyazani et al, 1993; Lees et al, 1995; Theodoridou et al, 2010). Toutefois, dans notre étude, les résultats sur ce critère « stade phénologique » paraissent les plus difficiles à interpréter puisqu'aucune différence statistique significative n'a été relevée entre les divers stades et que les relations apparentes après l'analyse multifactorielle (MCA) sont peu nettes.

De nombreuses études portant sur d'autres fourrages de la famille des Fabacea que le sainfoin ont montré une forte variabilité entre variétés en terme de contenu en PSMs (Jackson et Barry, 1996; Wang et Ueberschär, 1990; Lascano et al, 2003; Assefa et al, 2008). Le nombre très limité de variétés de sainfoin incluses dans le chapitre 2 rend anecdotique les conclusions portant sur ce facteur génétique. Par contre, il s'agit là de l'objectif principal du chapitre 3. La comparaison des propriétés AH entre les diverses variétés a mis en évidence de larges divergences puisque seuls 9 des 38 extraits méthanoliques et 6 des 14 extraits acétoniques ont montré des valeurs d'inhibitions de dégagement *in vitro* supérieures à 50 %. La mesure d'activité AH sur un nombre supérieur

d'extraits acétoniques est programmée. L'absence de concordance absolue dans les variétés actives identifiées selon le mode d'extraction opérée s'explique probablement par des différences relatives de rendement dans l'extraction de composés phénoliques ou de tannins à haut PM en fonction de ces deux protocoles méthodologiques (Mueller-Harvey, communication personnelle).

Les effets AH liés à divers modes d'utilisation ou de conservation du sainfoin avaient déjà été mesurés mais dans le cadre d'études séparées: sainfoin en vert (Heckendorn et al, 2006, 2007), sous forme de foin (Scharenberg et al, 2008; Heckendorn et al, 2006; Paolini et al, 2003b, 2005; Valderabano et al, 2010) ou d'ensilage (Heckendorn et al, 2006). Avec *Sericea lespedeza*, des résultats ont aussi indiqué que l'exploitation sous forme de bouchons concentrés n'annihilait pas les propriétés AH. C'est dans le cadre du chapitre 4 sur les modifications liées aux traitements méthodologiques (mode de conservation) appliquées au sainfoin que les conclusions sur les facteurs de variations d'activité paraissent les plus claires puisque les échantillons correspondant aux formes conservées (foin et ensilage) se sont globalement plus actifs que ceux issus de sainfoin en vert. Des bouchons de sainfoin n'étaient pas disponibles pour être inclus dans cette comparaison *in vitro*. Si ces données sont validées par la suite en conditions expérimentales comparées sur animaux infestés, ces conclusions devraient conduire à préférer ces formes conservées au sainfoin frais pour mieux valoriser cette Légumineuse comme nutriment.

L'ensemble des résultats issus de cette série d'études sur les facteurs de variations intra spécifiques affectant les propriétés AH d'une Légumineuse riche en tannins soulignent la nécessité de mieux comprendre le rôle des divers composés phénoliques impliqués de manière à pouvoir développer des méthodes de mesure indicatrices de la qualité et des propriétés potentielles des diverses sources de sainfoin en élevage. Plusieurs informations en ce sens peuvent déjà être tirées d'une synthèse des données résultant de l'analyse des relations entre variabilité d'efficacité et quantité et qualité des composés phénoliques présents.

## • Rôle respectif des divers métabolites phénoliques

### ➤ Role des tannins condensés

L'activité AH associée à diverses Légumineuses fourragères telles le sulla (*H.coronarium*), les lotiers corniculé (*L.corniculatus*) ou pédonculé (*L.pedunculatus*), le sericea lespedeza (*L.cuneata*) et le sainfoin (*O.viciifoliae*) a généralement été associée à la présence de

tannins. Comme seuls les tannins condensés (TC) sont présents chez ces Légumineuses, c'est logiquement à ces molécules qu'ont été attribuées les propriétés AH (Hoste et al, 2006)

Cette hypothèse d'un rôle majeur des TC se fonde sur plusieurs résultats convergents :

- la présence partagée/commune de ces composés polyphénoliques entre les diverses espèces de Fabacae citées (Bruneton 1999, Mueller Harvey 2006, Hoste et al, 2006)

- le fait que dans plusieurs essais *in vitro*, les effets AH constatés avec des extraits bruts de ces Légumineuses ont été annulés après addition d'inhibiteurs considérés comme étant spécifiques des tannins, tels le polyéthylène glycol (PEG) ou le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Cela a notamment été le cas pour la plupart des plantes examinées dans le chapitre 1/article 1

- un nombre beaucoup plus restreint d'études où l'activité antiparasitaire de fractions purifiées de TC (Molan et al, 2000b, c; Molan et al, 2003a; Molan et al, 2004; Barrau et al, 2005) a été confirmée directement.

Plusieurs de nos résultats viennent conforter ce rôle potentiel des tannins condensés. Il s'agit d'une part, des résultats de l'analyse multifactorielle opérée sur les données de l'article 1 /chapitre 1 où les valeurs de TT, CT et d'activité biologique, mesurée par diffusion radiale, sont nettement associées aux inhibitions de migration larvaire. De plus, dans le chapitre 2, la comparaison des 2 x 2 variétés à propriétés AH discriminées souligne une différence significative entre ces 2 catégories selon la teneur en TC et les mesures d'activité biologique.

#### ➤ **Activité anthelminthique et concentration en tannins**

L'existence d'une relation de type dose-réponse AH a souvent été observée dans les essais *in vitro* destinés à mesurer l'activité antiparasitaire de Légumineuses sur divers stades de nématodes: éclosion des œufs (Molan et al, 2002), développement des œufs en larves (Molan et al, 2002), inhibition de migration (Molan et al, 2000c; Paolini et al, 2004) ou de dégagement larvaire (Brunet et al, 2007), mobilité des vers adultes (Paolini et al 2004; Iqbal et al, 2007). Une relation similaire a été retrouvée pour les résultats *in vitro* de l'article 1, fondés sur le LMIA, qui portait sur la comparaison entre plusieurs espèces de plantes composant le couvert méditerranéen. L'existence de corrélations entre activité AH et concentration en tannins *in vivo* est aussi suggérée par les résultats de quelques études portant sur sericea lespedeza chez la chèvre (Terril et al, 2009), ou sur le sainfoin distribué à des ovins (Brunet et al, 2007) ainsi que par les conclusions d'une méta-analyse d'observations *in vivo* (Min et Hart, 2003). Toutefois, dans la plupart des cas cités, il était



impossible de savoir si cette relation était exclusivement liée aux TC ou dépendait aussi d'autres composés présents, comme d'autres polyphénols ou flavonoïdes.

De manière plus significative, des relations dose réponse ont également été mises en évidence lors des quelques études menées avec des TC purifiés (Molan et al 2003a, 2004) en se référant à des mesures biochimiques des TC.

Les résultats du chapitre 2 viennent confirmer et préciser cette relation dose-réponse en se référant non à des mesures biochimiques mais à des mesures d'activité biologique qui reflètent la formation de complexes entre tannins et protéines, ce qui correspond à la définition même des tannins: « des composés phénoliques hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 daltons et qui, à côté des réactions classiques des phénols, présentent la propriété de précipiter les alcaloïdes et les protéines» (Bate Smith et Swain, 1962 cités par Bruneton 1999). Plusieurs résultats acquis dans les divers chapitres de cette thèse ont mis en évidence de manière répétée des corrélations entre activité AH et mesures de l'activité biologique par diffusion radiale (cf chapitre 1, résultats de l'analyse multivariée, chapitre 2 comparaison des 2 X 2 extraits, chapitre 3, corrélations sur les 36 extraits méthanoliques et sur les 14 extraits acétoniques) alors que les corrélations avec les mesures biochimiques de tannins totaux ou de tannins condensés sont beaucoup moins fréquentes (chapitre 1 : résultats de l'analyse multivariée: chapitre 2 comparaison des 2 X 2 extraits pour les CT). Ces données suggèrent que la mesure de l'activité biologique par la méthode de diffusion radiale serait un meilleur reflet de l'activité AH des échantillons que celles fondées sur des réactions biochimiques comme la méthode de Folin-Ciocalteu pour les TT et les TP ou la méthode au butanol HCl ou à la vanilline HCl pour les TC. Ces résultats viennent soutenir l'idée de Mueller-Harvey (comm. personnelle) recommandant de combiner plusieurs modes de mesure (biochimiques et biologiques) pour mieux rendre compte de la diversité de structures et de propriétés des tannins. Cette meilleure relation trouvée avec les mesures d'activité biologique vient aussi corroborer une des hypothèses actuelles avancées pour expliquer une action de type pharmacologique des tannins. Elle se fonde sur l'existence d'interactions entre tannins et protéines des nématodes qui perturberaient plusieurs mécanismes biologiques indispensables chez les vers (Brunet et Hoste, 2006; Brunet et al, 2007).

#### ➤ **Influence de la nature et des caractéristiques des TC**

Molan et al, (2003b) ont les premiers émis l'hypothèse que la nature des TC pourrait influencer sur les propriétés AH associées chez les diverses Légumineuses étudiées. En se fondant

sur des observations *in vitro* et *in vivo*, ces auteurs ont notamment suggéré une activité AH plus marquée lorsque le ratio entre deux des 4 classes de TC : les prodelphinidines (PD) et les procyanidines (PC) est élevé. Les conséquences de variations affectant ce même ratio PD:PC sur les propriétés nutritionnelles des Légumineuses ont aussi été évoquées par Mueller-Harvey, (2006). Par la suite, deux études fondées surtout sur l'analyse des monomères de base des PD et PC sont venues confirmer cette hypothèse initiale d'une plus forte activité des PDs (Brunet et Hoste, 2006; Brunet et al, 2008). Les résultats acquis à ce sujet au cours de cette thèse conduisent à des conclusions contradictoires. La comparaison entre les 2 x 2 échantillons à activité AH fortement discriminée (chapitre 2) tend à confirmer une plus forte activité lorsque le ratio PD:PC est élevé. A l'inverse, l'analyse multivariée portant sur les 14 extraits acétoniques (chapitre 3) suggère plutôt une relation opposée. Deux points sont à souligner: a) les deux études portent sur un nombre limité d'échantillons et b) des interactions fortes entre le ratio PD:PC et d'autres caractéristiques des tannins du sainfoin (PM, ratio cis/trans, etc...) existent comme le montrent les données de l'ACP du chapitre 3. La confirmation expérimentale d'une différence d'activité marquée entre PD et PC reste difficile parce que PDs et PCs sont généralement présentes de manière concomitante dans les Légumineuses d'intérêt, bien qu'en proportion différente, et que, techniquement, leur séparation est quasi impossible.

Parmi les autres caractéristiques des TC du sainfoin (degré de polymérisation, poids moléculaire, ratio cis : trans) pour lesquelles les relations ont été examinées, les conclusions les plus cohérentes concernent le degré moyen de polymérisation (mDP). Que ce soit dans la comparaison des 2 x 2 échantillons actifs ou inactifs (chapitre 2), dans l'analyse multivariée portant sur les 14 échantillons acétoniques (chapitre 3), les résultats suggèrent que des tannins à plus faibles mDP seraient plus actifs que ceux à haut degré de polymérisation.

#### ➤ **Rôle des autres flavonoïdes**

La partie de l'étude du chapitre 3 portant sur les corrélations entre inhibition mesurée par la LEIA et les différents composés phénoliques présents dans les extraits méthanoliques est celle fournissant le plus d'informations sur un rôle possible, en dehors des TC, d'autres flavonoïdes dans l'activité AH des extraits de légumineuse. Cette étude montre l'absence d'activité associée à l'acide cafféique ou à l'arbutine ainsi qu'aux flavones. Elle souligne surtout que trois groupes de composés phénoliques auraient potentiellement des propriétés nématocides :

- L'acide cinnamique/hydroxycinnamique. Ce résultat est sans correspondance dans les études précédentes mais se trouve conforté par les données du chapitre 2 comparant les 2 x 2 extraits divergents en termes d'activité AH.
- Les flavanols : Les corrélations significatives trouvées dans le chapitre 3, sont confirmées par les différences significatives trouvées dans le chapitre 2. Ces données viennent confirmer aussi des résultats antérieurs qui avaient montré que les monomères constitutifs des TC, en particulier les gallates et les monomères de PD étaient dotées de propriétés AH mesurées par divers essais *in vitro* portant sur les larves 3 infestantes (Molan et al, 2003b; Brunet et Hoste, 2006; Brunet et al, 2008).
- Les flavonols : Leur présence est de manière globale associée aux propriétés AH des divers échantillons de sainfoin dans le chapitre 3 sur les extraits méthanoliques ainsi que dans les données de l'étude comparative du chapitre 2. Ces résultats viennent conforter les indications d'une étude portant sur la rutine, la narcissine et la nicotiflorine qui suggéraient des effets antiparasitaires associés aux fortes concentrations de ces composés (Barrau et al, 2005). De plus, ces données se trouvent fortement corroborées par les résultats du chapitre 4, qui soulignent que les formes non glycosidées seraient plus actives que celles glycosidées

## **CONCLUSIONS et PERSPECTIVES**

Les résultats de cette thèse ont confirmé *in vitro* et *in vivo* l'activité anthelminthique du sainfoin contre les Nématodes parasites du tractus gastro-intestinal des petits ruminants. Ils ont aussi souligné l'existence d'une forte variabilité d'activité, liée à des facteurs environnementaux, génétiques ou technologiques. L'analyse des différences de profils biochimiques liées à ces variations d'efficacité a permis de mieux comprendre le rôle de divers composés phénoliques dans les propriétés anthelminthiques du sainfoin.

Les résultats acquis ont d'abord confirmé l'implication des tannins condensés (proanthocyanidines), et l'existence d'une relation concentration-effet. Ils ont aussi souligné que certaines caractéristiques des tannins présents module fortement l'activité antiparasitaire.

L'activité associée aux flavan-3-ols et aux flavonols, dont les rôles respectifs avaient déjà été évoqués, a également été retrouvée. Toutefois, l'existence d'une différence forte entre formes glycosées et aglycosées des flavonols a été décrite pour la première fois de même que le rôle potentiel de composés phénoliques de faible PM tels les acides cinnamique et hydroxycinnamique ou l'acide coumarique.

A la suite de ces résultats acquis pour l'essentiel en conditions *in vitro*, une des perspectives les plus logiques est de chercher leur validation *in vivo* en comparant les effets de sainfoin fortement divergents selon les divers facteurs étudiés.

En termes d'applications agronomiques ou zootechniques, si certains des facteurs environnementaux évoqués (climat, facteurs de stress) ne peuvent être contrôlés, d'autres, comme le moment de récolte du sainfoin, pourraient être pris en compte pour bénéficier des différences d'activité observées selon le cycle ou le stade de croissance de la plante. De même, les facteurs relevant de la génétique ou de la technologie peuvent conduire à des applications maîtrisées (sélection de variétés appropriées ou amélioration des conditions technologiques de conservation du sainfoin pour préserver ses propriétés antiparasitaires).

Le développement de méthodes de dosage permettant d'identifier les échantillons de sainfoin, ou d'autres Légumineuses riches en tannins, à faible ou forte valeur ajoutée en vue d'une exploitation comme nutriment, suppose de poursuivre l'analyse des métabolites secondaires responsables de l'activité et d'identifier des marqueurs simples à doser. Enfin, l'examen des interactions entre composés phénoliques et macromolécules (protéines) parasitaires reste un des champs de recherche à défricher.

## **REFERENCES**

- Ademola, I.O., Idowu, O.S., 2006. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* seed extract on *Haemonchus contortus* infective larvae. *Veterinary Record* 158, 485-486.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 75, 1-12.
- Akkari, H., Ben Salem, H., Gharbi, M., Abidi, S., Darghouth, M.A., 2008a. Feeding *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage to Barbarine lambs with or without PEG: Effect on the excretion of gastro-intestinal nematode eggs. *Animal Feed Science and Technology* 147, 182-192.
- Akkari, H., Darghouth, M.A., Ben Salem, H., 2008b. Preliminary investigations of the anti-nematode activity of *Acacia cyanophylla* Lindl.: Excretion of gastrointestinal nematode eggs in lambs browsing *A. cyanophylla* with and without PEG or grazing native grass. *Small Ruminant Research* 74, 78-83.
- Albers, G.A.A., Gray, G.D., Piper, L.R., Barker, J.S.F., Le Jambre, L.F., Barger, I.A., 1987. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young Merino sheep. *International Journal for Parasitology* 17, 1355-1363.
- Alonso-Diaz, M.A., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., Brunet, S., Hoste, H., 2008. Effects of four tropical tanniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology* 153, 187-192.
- Alonso-Diaz, M.A., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2010. Comparing anthelmintic activity of tropical tannin rich extracts against *H. contortus* using larvae motility or exsheathment *in vitro* techniques. submitted to *Veterinary Parasitology*.
- Alvarez-Sanchez, M.A., Garcia, J.P., Bartley, D., Jackson, F., Rojo-Vazquez, F.A., 2005. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology* 110, 56-61.
- Andlauer, W., Fürst, P., 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International* 35, 171-176.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahlu, T., Varel, V.H., Wells, J., 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology* 144, 212-227.
- Artho, R., Schnyder, M., Kohler, L., Torgerson, P.R., Hertzberg, H., 2007. Avermectin-resistance in gastrointestinal nematodes of Boer goats and Dorper sheep in Switzerland. *Veterinary Parasitology* 144, 68-73.
- Assefa, G., Sonder, K., Wink, M., Kijora, C., Steinmueller, N., Peters, K.J., 2008. Effect of variety and harvesting management on the concentration of tannins and alkaloids in tagasaste (*Chamaecytisus palmensis*). *Animal Feed Science and Technology* 144, 242-256.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000a. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 30, 1025-1033.

- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000b. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Record* 146, 728-732.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001a. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *British Journal of Nutrition* 86, 697-706.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001b. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 99, 205-219.
- Athanasiadou, S., Tzamaloukas, O., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Veterinary Parasitology* 127, 233-243.
- Ayres, M.P., Clausen, P.H., MacLean, S.F., Redman, A.M., Reichart, P.B., 1997. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology* 78, 1696-1712.
- Baba-Moussa, F., Akpagana, K., Bouchet, P., 1999. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 335-338.
- 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.
- Baker, R.L., Mwamachi, D.M., Audho, J.O., Aduda, E.O., Thorpe, W., 1998. Resistance of Galla and Small East African goats in the sub-humid tropics to gastrointestinal nematode infections and the peri-parturient rise in faecal egg counts. *Veterinary Parasitology* 79, 53-64.
- Balic, A., Bowles, V.M., Meeusen, E.N., 2000. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advances in Parasitology* 45, 181-241.
- Barger, I., 1997. Control by management. *Veterinary Parasitology* 72, 493-506.
- Barger, I.A., 1999. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *International Journal for Parasitology* 29, 41-47.
- Barnes, E.H., Dobson, R.J., Barger, I.A., 1995. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today* 11, 56-63.
- Barrau, E., 2003. Etude de l'activité anthelminthique du sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) sur les parasites gastro-intestinaux de la chèvre. Toulouse, France. rapport de stage de Master Sciences des Agroressources 35 pages
- 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.



- Barry, T.N., 1985. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. Rates of body and wool growth. *British Journal of Nutrition* 54, 211-217.
- Barry, T.N., McNabb, W.C., 1999. The effect of condensed tannins in temperate forages on animal nutrition and productivity. In: Brooker, J.D. (Ed). *Tannins in livestock and human nutrition* : ACIAR Proceedings, Canberra, Australia, pp. 30-35.
- Bartley, D.J., Jackson, E., Johnston, K., Coop, R.L., Mitchell, G.B.B., Sales, J., Jackson, F., 2003. A survey of anthelmintic resistant nematode parasites in Scottish sheep flocks. *Veterinary Parasitology* 117, 61-71.
- Bate-Smith, E., 1973. Tannins of herbaceous leguminosae. *Phytochemistry* 12, 1809 -1812.
- Bengone-Ndong, T., Alvinerie, M., 2004. Macrolides antiparasitaires: propriétés pharmacologiques générales et recommandations d'usage dans le contexte vétérinaire africain. *Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 57, 49-58.
- Bennick, A., 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 13, 184-196.
- Bernes, G., Waller, P.J., Christensson, D., 2000. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and white clover (*Trifolium repens*) in mixed pasture swards on incoming and established nematode infections in young lambs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 41, 351-361.
- Besier, B., 2007. New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends in Parasitology* 23, 21-24.
- Beugnet, F., Gevrey, J., Kerboeuf, D., 1997. Les endectocides: mode d'action et utilisation. *Le Point Vétérinaire* 28 (numéro spécial), 1915-1919.
- Borreani, G., Peiretti, P.G., Tabacco, E., 2003. Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) in the spring growth cycle. *Agronomy for Sustainable Development* 23, 193-201.
- Bown, M.D., Poppi, D.P., Sykes, A.R., 1991. The effects of post-ruminal infusion of protein or energy on the pathophysiology of *Trichostrongylus colubriformis* infection and body composition in lambs. *Australian Journal Agricultural Research* 13, 87-95.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Review* 56, 317-333.
- Brugère-Picoux, J., 2004. *Maladies des moutons*, 2ème édition. Editions France Agricole Paris. (p 287).
- 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., Aufrère, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134, 1253-1262.

- Brunet, S., 2008. Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants. Doctorat de l'Université de Toulouse, France (p 246).
- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008. 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., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C.M., Hoste, H., 2008a. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of parasitic nematodes in goats. *Veterinary Parasitology* 157, 81-88.
- Bruneton, J., 1999. Tannins. In: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, TEC&DOC (Ed), Paris, pp. 369-404.
- Burke, J.M., Soli, F., Miller, J.E., Terrill, T.H., Wildeus, S., Shaik, S.A., Getz, W.R., Vanguru, M., 2010. Administration of copper oxide wire particles in a capsule or feed for gastrointestinal nematode control in goats. *Veterinary Parasitology* 168, 346-350.
- Butter, N.L., Dawson, J.M., Buttery, P.J., 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. In: *Secondary Plant Products*, Nottingham-University-Press (Ed.), Nottingham pp. 51-70.
- Cadot, Y., Miñana Castello, M.T., Chevalier, M., 2006. Flavan-3-ol compositional changes in grape berries (*Vitis vinifera* L. cv *Cabernet Franc*) before veraison, using two complementary analytical approaches, HPLC reversed phase and histochemistry. *Analytica Chimica Acta* 563, 65-75.
- Caygill, C.J., Mueller-Harvey, I., 1999. *Secondary Plant Products: Antinutritional and beneficial actions in animal feeding*. Nottingham University Press, UK (129 p).
- Cenci, F.B., Louvandini, H., McManus, C.M., Dell'Porto, A., Costa, D.M., Araujo, S.C., Minho, A.P., Abdalla, A.L., 2007. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Veterinary Parasitology* 144, 132-137.
- Chagas, A.C.S., Vieira, L.S., Freitas, A.R., Araújo, M.R.A., Araújo-Filho, J.A., Araguayo, W.R., Navarro, A.M.C., 2008. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes® in Morada Nova sheep. *Veterinary Parasitology* 151, 68-73.
- Chandrawathani, P., Adnan, M., Waller, P.J., 1999. Anthelmintic resistance in sheep and goat farms on Peninsular Malaysia. *Veterinary Parasitology* 82, 305-310.
- Chandrawathani, P., Jamnah, O., Adnan, M., Waller, P.J., Larsen, M., Gillespie, A.T., 2004. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology* 120, 177-187.
- Chartier, C., Reche, B., 1992. Gastrointestinal helminths and lungworms of french dairy goats: prevalence and geographical distribution in Poitou-Charentes. *Veterinary Research Communications* 16, 327-335.

- Chartier, C., Hoste, H., 1994. Anthelmintic treatments against digestive tract nematodes in grazing dairy goats with high or low levels of milk production. *Veterinary Research* 25, 450-457.
- Chartier, C., Hoste, H., 1997. La thérapeutique anthelminthique chez les caprins. *Le Point Vétérinaire* 28, 1907-1914.
- Chartier, C., Itard, J., Morel, P., Troncy, P., 2000. Précis de parasitologie vétérinaire tropicale. Collection Universités Francophones. Lavoisier Tech & Toc, Paris (p 796).
- Chartier, C., Soubirac, F., Pors, I., Silvestre, A., Hubert, J., Couquet, C., Cabaret, J., 2001. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *Journal of Helminthology* 75, 325-330.
- Chung, K.T., Wei, C.-I., Johnson, M.G., 1998. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology* 9, 168-175.
- Clauss, M., Lason, K., Gehrke, J., Lechner-Doll, M., Fickel, J., Grune, T., Streich, W.J., 2003. Captive roe deer (*Capreolus capreolus*) select for low amounts of tannic acid but not quebracho: fluctuation of preferences and potential benefits. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 136, 369-382.
- Coles, C.G., Simpkin, K.G., 1977. Resistance of nematode eggs to the ovicidal activity of benzimidazoles. *Research in Veterinary Science* 22, 386-387.
- Coles, G., Roush, R., 1992. Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the United Kingdom; *Veterinary Record* 130, 505-510.
- Coles, C.G., 2002. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? *Veterinary Research* 33, 481-489.
- Collingborn, F.M.B., Gowen, S.R., Mueller-Harvey, I., 2000. Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5297-5301.
- Coop, R.L., Kyriazakis, I., 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology* 17, 325-330.
- Cuckler, A.C., 1961. Thiabendazole, A new broad spectrum anthelmintic. *Journal for Parasitology* 47 : 36-37 (Suppl.)
- Dakkak, A., Fioramonti, J., Bueno, L., 1981. *Haemonchus contortus* third-stage larvae in sheep: kinetics of arrival into the abomasum and transformation during rumino-omasal transit. *Research in Veterinary Science* 31, 384-385.
- Decandia, M., Sitzia, M., Cabiddu, A., Kababya, D., Molle, G., 2000. The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in goats fed woody species. *Small Ruminant Research* 38, 157-164.

- Deepak, M., Dipankar, G., Prashanth, D., Asha, M.K., Amit, A., Venkataraman, B.V., 2002. Tribulosin and beta-sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. *Phytomedicine* 9, 753-756.
- Delatour, P., Cure, M.C., Benoit, E., Garnier, F., 1986. Netobimin (Totabin-SCH.): preliminary investigation on metabolism and pharmacology. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 9, 230-234.
- Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruysse, J., von Samson-Himmelstjerna, G. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology* 174, 58-64.
- De Rosa, 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
- Durette-Desset, M.-C., Baker, J.R., Muller, R., 1985. Trichostrongyloid nematodes and their vertebrate hosts: Reconstruction of the phylogeny of a parasitic group. *Advances in Parasitology* 24, 239-306.
- Dynes, R.A., Ankersmit, A.E.L., Poppi, D.P., Barrell, G.K., Sykes, A.R., 1990. Studies on the physiological basis of appetite depression in nematode infection in sheep. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 50, 249-253.
- Dynes, R.A., Poppi, D.P., Barrell, G.K., Sykes, A.R., 1998. Elevation of feed intake in parasite infected lambs by central administration of a cholecystokinin receptor antagonist. *British Journal of Nutrition* 79, 47-54.
- Erzen, N.K., Kolar, N.K., Flajs, V.C., Kuzner, J., Irena, M., Pogacnik, M., 2005. Degradation of abamectin and doramectin on sheep grazed pasture. *Ecotoxicology* 14, 627-635.
- Etter, E., Chartier, C., Hoste, H., Pors, I., Lefrileux, Y., Broqua, C., Vallade, S., Goudeau, C., 2000. Parasitisme par les nématodes du tube digestif et utilisation du pâturage: Epidémiologie de l'infestation dans les troupeaux caprins laitiers en France. *Epidémiologie et Santé Animale* 37, 75-86.
- Euzéby, J., 1963. Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine, tome II : maladies dues aux plathelminthes, fascicule premier :Cestodes. Vigot frères éditeurs, Paris (p 664).
- Feucht, W., Treutter, D., Christ, E., 1997. Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiology* 17, 335-340.
- Feucht, W., Treutter, D., 1999. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defense. In: *Principles and practices in chemical ecology*, CRC Press, B.R., S. (Ed.), pp. 307-338.
- Fontenot, M.E., Miller, J.E., Pena, M.T., Larsen, M., Gillespie, A., 2003. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology* 118, 203-213.
- Foo, L.Y, Jones, W.T., Porter, L.J., Williams, V.M., 1982. Proanthocyanidin polymers of fodder legumes. *Phytochemistry* 21, 933-935.

- Foo, L.Y., Newman, R., Waghorn, G., McNabb, W.C., Ulyatt, M.J., 1996. Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*. *Phytochemistry* 41, 617-624.
- Foo, L.Y., Lu, Y., McNabb, W.C., Waghorn, G., Ulyatt, M.J., 1997. Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry* 45, 1689-1696.
- Fox, M.T., Gerrelli, D., Shivalkar, P., Jacobs, D.E., 1989. Effect of omeprazole treatment on feed intake and blood gastrin and pepsinogen levels in the calf. *Research in Veterinary Science* 46, 280-282.
- Fox, M.T., 1997. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology* 72, 285-308.
- Frutos, P., Hervas, G., Ramos, G., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., 2002. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology* 95, 215-226.
- Frutos, P., Raso, M., Hervás, G., Mantecon, A.R., Perez, V., Giraldez, F.J., 2004. Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs? *Animal Research* 53, 127-136.
- Frutos, P., Moreno-Gonzalo, J., Hervás, G., García, U., Ferreira, M.M.L., Celaya, R., Toral, G.P., Ortega-Mora, M.L., Ferre, I., Osoro, K., 2008. Is the anthelmintic effect of heather supplementation to grazing goats always accompanied by anti-nutritional effects? *Animal* 2, 1449-1456.
- Gamble, H.R., Lichtenfield, 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.
- Garretson, D.P., 2007. Role of p-glycoproteins in *Haemonchus contortus* anthelmintic resistance. Master of Science Submitted to the office of graduate studies of Texas A&M University (p 115).
- Gasnier, N., Cabaret, J., Chartier, C., Reche, B., 1997. Species diversity in gastrointestinal nematode communities of dairy goats: species-area and species-climate relationship. *Veterinary Research* 28, 55-64.
- Geary, T.G., Sims, M.S., Thomas, M.E., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F.H., Tompson, P.D., 1993. *Haemonchus contortus* ivermectin induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology* 77, 88-96.
- Geary, T.G., 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in Parasitology* 21, 530-532.
- Gerwert, S., Failing, K., Bauer, C., 2002. Prevalence of levamisole and benzimidazole resistance in *Oesophagostomum* populations of pig-breeding farms in North Rhine-Westphalia, Germany. *Parasitology Research* 88, 63-68.
- Gilboa, N., Perevolotsky, A., Landau, S., Nitsan, Z., Silanikove, N., 2000. Increasing productivity in goats grazing Mediterranean woodland and scrubland by supplementation of polyethylene glycol. *Small Ruminant Research* 38 183-190.

- Gill, J.H., Lacey, E., 1998. Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *International Journal for Parasitology* 28, 863-877.
- Githiori, J.B., Hoglund, J., Waller, P.J., 2005. Ethnoveterinary plant preparations as livestock dewormers: practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for the future. *Animal Health Research Reviews* 6, 91-103.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology* 139, 308-320.
- Hagerman, A.E., 1992. Tannin protein interactions. In: Phenolic compounds in food and their effects on health: Analysis, occurrence and chemistry. Ho, Lee et Huang (Eds.), American chemical society, Washington DC pp. 236-247.
- Hagerman, A.E. 2002 ([www.users.muohio.edu/hagermae](http://www.users.muohio.edu/hagermae)).
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Haslam, E., 2007. Vegetable tannins-Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68, 2713-2721.
- Hässig, A., Schwabl, H., Stampfli, K., 1999. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Medical Hypotheses* 52, 479-481.
- Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T-o., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 66, 2047-2055.
- Heckendorn, F., Häring, D.A., Maurer, V., Zinsstag, J., Langhans, W., Hertzberg, H., 2006. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Veterinary Parasitology* 142, 293-300.
- Heckendorn, F., 2007. The control of gastrointestinal sheep nematodes with tanniferous forage plants. PhD Thesis of Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Suisse (p 73).
- Heckendorn, F., Haring, D.A., Maurer, V., Senn, M., Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Veterinary Parasitology* 146, 123-134.
- Hedqvist, H., Mueller-Harvey, I., Reed, J.D., Krueger, C.G., Murphy, M., 2000. Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology* 87, 41-56.
- 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.
- Hervas, G., Perez, V., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., Almar, M.M., Frutos, P., 2003. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *Journal of Comparative Pathology* 129, 44-54.



- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Carulla, J.E., Kreuzer, M., 2006a. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. International Congress Series 1293, 164-167.
- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Stürm, C.D., Carulla, J.E., Lascano, C.E., Kreuzer, M., 2006b. Effects of tannins on ruminal degradation and excretory pattern of N and implications for the potential N emission from the manure. International Congress Series 1293, 339-342.
- Hördegen, P., Cabaret, J., Hertzberg, H., Langhans, W., Maurer, V., 2006. *In vitro* screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay. Journal of Ethnopharmacology 108, 85-89.
- Hoskin, S.O., Wilson, P.R., Barry, T.N., Charleston, W.A., Waghorn, G.C., 2000. Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dictyocaulus sp.*) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). Research in Veterinary Science 68, 223-230.
- Hosking, B.C., Stein, P.A., Mosimann, D., Seewald, W., Strehlau, G., Kaminsky, R., 2008. Dose determination studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. Veterinary Parasitology 157, 72-80.
- Hosking, B.C., Dobson, D.P., Stein, P.A., Kaminsky, R., Bapst, B., Mosimann, D., Mason, P.C., Seewald, W., Strehlau, G., Sager, H., 2009. Dose confirmation studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. Veterinary Parasitology 160, 251-257.
- Hoste, H., Chartier, C., 1993. Comparison of the effects on milk production of concurrent infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in high- and low-producing dairy goats. American Journal of Veterinary Research 54, 1886-1893.
- Hoste, H., Nano, J.L., Mallet, S., Huby, F., Fournel, S., Rampal, P., 1995. Stimulation of HT29-D4 cell growth by excretory/secretory products of the parasite nematode *Trichostrongylus colubriformis*. Epithelial Cell Biology 4, 87-92.
- Hoste, H., Huby, F., Mallet, S., 1997. Strongyloses gastro-intestinales des ruminants: conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. Le Point Vétérinaire 28, 53-59.
- Hoste, H., Le Frileux, Y., Pommaret, A., Gruner, L., Van Quackebecke, E., Koch, C., 1999. Importance du parasitisme par des strongles gastro-intestinaux chez les chèvres laitières dans le Sud-Est de la France. INRA Productions Animales 12, 377-389.
- Hoste, H., Leveque, H., Dorchies, P., 2001. Comparison of nematode infections of the gastrointestinal tract in Angora and dairy goats in a rangeland environment: relations with the feeding behaviour. Veterinary Parasitology 101, 127-135.
- Hoste, H., Guitard, J.P., J.C, P., 2003. Pâturage mixte entre ovins et bovins: intérêt dans la gestion des strongyloses gastro intestinales. Fourrages 176, 425-436.
- Hoste, H., Paolini, V., Paraud, C., Chartier, C., 2004. Gestion non-chimique du parasitisme par les nématodes chez les petits ruminants. Bulletin G.T.V. Hors-série Parasitologie des ruminants laitiers, 131-135.

- Hoste, H., Gaillard, L., Le Frileux, Y., 2005a. Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats. *Small Ruminant Research* 59, 265-271.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., Paolini, V., Aguilar-Caballero, A., Etter, E., Lefrileux, Y., Chartier, C., Broqua, C., 2005b. Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research* 60, 141-151.
- 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., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I., 2010. Goat-nematode interactions: think differently. *Trends in Parasitology* 26, 376-381.
- Houngangbe-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.
- Houngangbe-Adote, S., 2004. Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonke. Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record* 130, 442-446.
- Huby, F., Nano, J.L., Mallet, S., Hoste, H., 1999a. Effects of the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis* on the growth of different cell lines. *International Journal for Parasitology* 29, 697-702.
- Huby, F., Mallet, S., Hoste, H., 1999b. Role of acetylcholinesterase (AChE) secreted by parasitic nematodes on the growth of the cell line from epithelial origin HT29-D4. *Parasitology* 118, 489-498.
- Hunt, K.R., Taylor, M.A., 1989. Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes. *Veterinary Record* 125, 153-154.
- Iqbal, Z., Sarwar, M., Jabbar, A., Ahmed, S., Nisa, M., Sajid, M.S., Khan, M.N., Mufti, K.A., Yaseen, M., 2007. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. *Veterinary Parasitology* 144, 125-131.
- Jackson, F., 1993. Anthelmintic resistance-The state of play. *British Veterinary Journal* 149, 123-138.
- Jackson, F., Coop, R.L., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120, 95-97.
- Jackson, F., Miller, J., 2006. Alternative approaches to control-Quo vadit? *Veterinary Parasitology* 139, 371-384.
- Jackson, S.F., Barry, T.N., 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 103-110.



- Jackson, F., Hoste, H., 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes, In : *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. (Ed), Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, pp. 25-45.
- Jean-Blain, C., 1998. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Revue de Médecine Vétérinaire* 149, 911-920.
- Jensen, J., Henning Krogh, P., Sverdrup, L.E., 2003. Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). *Chemosphere* 50, 437-443.
- Johansen, V.M., 1989. An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock. *Veterinary Research Communications* 13, 455-466.
- Jones, W.T., Mangan, W.T., 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28, 126 - 136.
- Jung, Y.D., Ellis, L.M., 2001. Inhibition of tumour evasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *International Journal of Experimental Pathology* 82, 309-316.
- Kabasa, J.D., Opuda-Asibo, J., ter Meulen, U., 2000. The effect of oral administration of polyethylene glycol on faecal helminth egg counts in pregnant goats grazed on browse containing condensed tannins. *Tropical Animal Health and Production* 32, 73-86.
- Kabasa, J.D., Opuda-Asibo, J., Ter Meulen, U., 2001. Tannins enhance the erythron function and deter the development of anaemia in pregnant goats browsing in an east African natural rangeland. *Journal of Agriculture in the Tropics and Sub-tropics* 102, 75-85.
- Kahiya, C., Mukaratirwa, S., Thamsborg, S.M., 2003. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Veterinary Parasitology* 115, 265-274.
- Kahn, L.P., Diaz-Hernandez, A., 2000. Tannins with anthelmintic properties. In: *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings of International Workshop*, n. 92, Brooker, (Ed.), Adelaide, Australia.
- Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., Goebel, T., Hosking, C.B., Pautrat, F., Wieland-Berghausen, S., Ducray, P., 2008. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research* 103, 931-939.
- Kaminsky, R., Mosimann, D., Sager, H., Stein, P., Hosking, B., 2009. Determination of the effective dose rate for monepantel (AAD 1566) against adult gastro-intestinal nematodes in sheep. *International Journal for Parasitology* 39, 443-446.

- Kaplan, M.R., 2002. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research* 33, 491-507.
- Kaplan, R.M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* 20, 477-481
- Kerboeuf, D., Blackhall, W., Kaminsky, R., von Samson-Himmelstjerna, G., 2003. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22, 332-346.
- Ketzis, J.K., Vercruysse, J., Stromberg, B.E., Larsen, M., Athanasiadou, S., Houdijk, J.G., 2006. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. *Veterinary Parasitology* 139, 321-335.
- Knox, D.P., Smith, S.K., Redmond, D.L., Smith, W.D., 2005. Protection induced by vaccinating sheep with a thiol-binding extract of *Haemonchus contortus* membranes is associated with its protease components. *Parasite Immunology* 27, 121-126.
- Knox, M.R., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J., 2006. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 139, 385-393.
- Koupai-Abyazani, M.R., Muir, A.D., Bohm, B.A., Towers, G.H.N., Gruber, M.Y., 1993. The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry* 34, 113-117.
- Kyriazakis, I., Anderson, D.H., Oldham, J.D., Coop, R.L., Jackson, F., 1996. Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Veterinary Parasitology* 61, 297-313.
- Kyriazakis, I., Houdijk, J., 2006. Immunonutrition: Nutritional control of parasites. *Small Ruminant Research* 62, 79-82.
- Landau, S., Silanikove, N., Nitsan, Z., Barkai, D., Baram, H., Provenza, F.D., Perevolotsky, A., 2000. Short-term changes in eating patterns explain the effects of condensed tannins on feed intake in heifers. *Applied Animal Behaviour Science* 69, 199-213.
- Lange, K.C., Olcott, D.D., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Terrill, T.H., Burke, J.M., Kearney, M.T., 2006. Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Veterinary Parasitology* 141, 273-278.
- Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1990. Pharmacokinetic behaviour of netobimin and its metabolites in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 13, 170-178.
- Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Clinical pharmacokinetics and metabolism of benzimidazole anthelmintics in ruminants. *Drug Metabolism Reviews* 25, 235-279.
- Larsen, M., Anderson, D.H., Vizard, A., Anderson, G.A., Hoste, H., 1994. Diarrhoea in Merino ewes during winter: association with trichostrongylid larvae. *Australian Veterinary Journal* 71, 365-372.
- Larsen, M., 2000. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology* 120, 121-131.

- Lascano, C.E., Avila, P., Stewart, J.T., 2003. Intake, digestibility and nitrogen utilization by sheep fed with provenances of *Calliandra calothyrsus* Meissner with different tannin structure. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal* 11, 1-8.
- Le Jambre, L.F., Southcott, W.H., Dash, K.M., 1976. Resistance of selected lines of *Haemonchus contortus* to thiabendazole, morantel, tartrate and levamisole. *International Journal for Parasitology* 6, 217-222
- Leathwick, D.M., Atkinson, D.S., 1996. Influence of different proportions of *Lotus corniculatus* in the diet of lambs on dags, flystrike and animal performance. *New Zealand Society of Animal Production*, 99-102.
- Lees, G.L., Grube, M.Y., Suttill, N.H., 1995. Condensed tannins in sainfoin. II. Occurrence and changes during leaf development. *Canadian Journal of Botany* 73, 1540-1547.
- Legarto, J., Leclerc, M.C., 2007. Guide pour la conduite du pâturage caprin. Institut de l'Elevage (p 211).
- Lespine, A., Alvinerie, M., Vercruyssen, J., Prichard, R.K., Geldhof, P., 2008. ABC transporter modulation: a strategy to enhance the activity of macrocyclic lactone anthelmintics. *Trends in Parasitology* 24, 293-298.
- Leto, G., Todaro, M., Di Noto, A.M., Alicata, M.L., 2002. Comparaison of sulla-hay and sulla-silage in the lactating ewes and their effects on milk and cheese characteristics. *Small Ruminant Research* 45, 301-306.
- Lim, Y.Y., Lim, T.T., Tee, J.J., 2007. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry* 103, 1003-1008.
- Lin, N.K., Preston, T.R., Binh, D.V., Ly, N.D., 2003. Effects of three foliages compared with grasses on growth and intestinal nematode infestation in confined goats. *Livestock Research for Rural Development* 15, 1-9.
- Lu, Y., Sun, Y., Foo, L.Y., McNabb, W.C., Molan, A.L., 2000. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis vicifolia*. *Phytochemistry* 55, 67-75.
- Lumaret, J.P., 1986. Toxicité de certains helminthocides vis-à-vis des insectes coprophages et conséquences sur la disparition des excréments de la surface du sol. *Acta Oecologia, Oecologia Applicata* 7, 313-324.
- Lumaret, J.P., Errouissi, F., 2002. Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Veterinary Research* 33, 547-562.
- Luque, A., Barry, T.N., McNabb, W.C., Kemp, P.D., McDonald, M.F., 2000. The effect of grazing *Lotus corniculatus* during summer-autumn on reproductive efficiency and wool production in ewes. *Australian Journal of Agricultural Research* 51, 385-391.
- Maasdorp, B.V., Muchenje, V., Titterton, M., 1999. Palatability and effect on dairy cow milk yield of dried fodder from the forage trees *Acacia boliviana*, *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology* 77, 49-59.
- Mahieu, M., Archimède, H., Fleury, J., Mandonnet, N., Alexandre, G., 2008. Intensive grazing system for small ruminants in the Tropics: The French West Indies experience and perspectives. *Small Ruminant Research* 77, 195-207.

- Makkar, H.P., Dawra, R.K., Singh, B., 1991. Tannin levels in leaves of some oak species at different stages of maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54, 513-519.
- Makkar, H.P.S., Blummel, H.P., Becker, K., 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition* 73, 897-913.
- Makkar, H.P., 2000. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. In: *A Laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy (FAO / IAEA), Vienna, Austria* (p 26).
- Makkar, H.P.S., 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* 49, 241-256.
- Mallet, S., Lesage, M.C., 1987. Relationship between exsheathment and enzyme activity (alkaline phosphatase and leucine amino peptidase) during ageing of *Trichostrongylus colubriformis* infective larvae. *Annales de Recherches Vétérinaire* 18, 275-278.
- Marais, J.P.J., Mueller-Harvey, I., Brandt, E.V., Ferreira, D., 2000. Polyphenols, condensed tannins and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3440-3447.
- Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J., Lampkin, N.H., 2003. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Veterinary Parasitology* 112, 147-155.
- Marley, C.L., Cook, R., Barrett, J., Keatinge, R., Lampkin, N.H., 2006. The effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) when compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on ovine gastrointestinal parasite development, survival and migration. *Veterinary Parasitology* 138, 280-290.
- Martin, R.J., Robertson, A.P., Wolstenholme, A.J., 2002. Mode of action of macrocyclic lactones. In: *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. Edited by Vercruysse J. et Rew R.S, CABI publishing, UK, 125-140.
- Martínez-Ortíz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology* 172, 283-290.
- Martinez-Ortiz de Montellano, C., 2010. Mécanismes d'action de plantes riches en tanins sur les nématodes gastrointestinaux adultes de petits ruminants. 2010 Doctorat de l'Université de Toulouse (p 145).
- Max, R.A., Kimambo, A.E., Kassuku, A.A., Mtenga, L.A., Buttery, P.J., 2004. The effect of wattle tannin drench or an acacia meal supplement on faecal egg counts and total worm burdens of tropical sheep with an experimental nematode infection. In: *Small stock in development proceedings of a workshop on enhancing the contribution of small livestock to the livelihoods of resource-poor communities, Masaka, Uganda*.

- Mbhata, K.R., Downs, C.T., Nsahlai, I.V., 2002. The effect of graded levels of dietary tannin on the epithelial tissue of the gastro-intestinal tract and liver and kidney masses of boer goats. *Animal Sciences* 74, 579-586.
- Mc Kellar, Q.A., 1997. Ecotoxicity and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology* 72, 413-435.
- McNabb, W.C., Waghorn, G., Barry, T.N., Shelton, I.D., 1993. The effect of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on the digestion and metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphur in sheep. *British Journal of Nutrition* 70, 647-661
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., Krause, D.O., 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 91, 83-93.
- McSweeney, C.S., Collins, E.M.C., Blackall, L.L., Seawright, A.A., 2008. A review of anti-nutritive factors limiting potential use of *Acacia angustissima* as a ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology* 147, 158-171.
- Min, B.R., Fernandez, J.M., Barry, T.N., McNabb, W.C., Kemp, P.D., 2001. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in ewes during autumn. *Animal Feed Science and Technology* 92, 185-202.
- 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., Hart, S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science* 81, 102-109.
- Min, B.R., Pomroy, W.E., Hart, S.P., Sahlu, T., 2004. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Ruminant Research* 51, 279-283.
- Min, B.R., Hart, S.P., Miller, D., Tomita, G.M., Loetz, E., Sahlu, T., 2005. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastro-intestinal parasite infection and milk composition in Angora does. *Veterinary Parasitology* 130, 105-113.
- Minho, A.P., Bueno, I.C.S., Louvandini, H., Jackson, F., Gennari, S.M., Abdalla, A.L., 2008. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 147, 172-181.
- Molan, A.L., Alexander, R.A., Brookes, I.M., McNabb, W.C., 2000a. Effect of an extract from sulla (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. *Proceedings of New Zealand Society of Animal Production* 60, 21-25.
- Molan, A.L., Hoskin, S.O., Barry, T.N., McNabb, W.C., 2000b. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Veterinary Record* 147, 44-48.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., Min, B.R., McNabb, W.C., 2000c. The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitologica (Praha)* 47, 39-44.

- Molan, A.L., Waghorn, G.C., McNabb, W.C., 2002. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Veterinary Record* 150, 65-69.
- Molan, A.L., Duncan, A.J., Barry, T.N., McNabb, W.C., 2003a. Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology International* 52, 209-218
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003b. 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.
- Molan, A.L., Sivakumaran, S., Spencer, P.A., Meagher, L.P., 2004. Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Research in Veterinary Science* 77, 239-243.
- Molle, G., Decandia, M., Fois, S., Ligios, S., Cabiddu, A., Sitzia, M., 2003. The performance of Mediterranean dairy sheep given access to sulla (*Hedysarum coronarium* L.) and annual ryegrass (*Lolium rigidum* Gaudin) pastures in different time proportions. *Small Ruminant Research* 49, 319-328.
- Moore, K.M., Barry, T.N., Cameron, P.N., Lopez-Villalobos, N., Cameron, D.J., 2003. Willow (*Salix* sp.) as a supplement for grazing cattle under drought conditions. *Animal Feed Science and Technology* 104, 1-11.
- Mueller-Harvey, I., McAllan, A.B., 1992. Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology. In : Tannins: Their biochemistry and nutritional properties. Morrison I. M. (Ed.), JAI Press Ltd., London, 151-217.
- Mueller-Harvey, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91, 3-20.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 2010 - 2037.
- Mulligan, W., Gorrell, M.D., Richard, M.D., Brandon, M., 1989. The use of irradiated larvae as immunising agents in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* infections in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 12, 1175-1187.
- Newton, S.E., 1995. Progress on vaccination against *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* 25, 1281-1289
- Nguyen, T.M., Van Binh, D., Orskov, E.R., 2005. Effect of foliages containing condensed tannins on gastrointestinal parasites. *Animal Feed Science and Technology* 121, 77-87.
- Niezen, J.H., Waghorn, T.S., Charleston, W.A., Waghorn, G.C., 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *Journal of Agricultural Science* 125,, 281-289.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Leathwick, D.M., 1996. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics:



- Approaches, experiences and prospects. *International Journal for Parasitology* 26, 983-992.
- Niezen, J.H., Robertson, H.A., Waghorn, G., Charleston, W.A., 1998a. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Veterinary Parasitology* 80, 15-27.
- Niezen, J.H., Waghorn, G., Charleston, W.A., 1998b. Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*L.pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Veterinary Parasitology* 78, 13-21.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Robertson, H.A., Shelton, I.D., Waghorn, G., 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.
- Norton, B.W., 1999. The significance of tannins in tropical animal production. In: Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings of International Workshop, 92, pp. 14-23, Brooker, (Ed), Adelaide, Australia.
- O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P., 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology* 142, 1-15.
- O'Grady, J., Kotze, C.A., 2004. *Haemonchus contortus*: *in vitro* drug screening assays with the adult life stage. *Experimental Parasitology* 106, 164-172.
- Osoro, K., Benito-Peña, A., Frutos, P., Garcia, P.M., Ortega-Mora, L.M., Celaya, R., Ferre, I., 2007a. The effect of heather supplementation on gastrointestinal nematode infections and performance in Cashmere and local Celtiberic goats on pasture. *Small Ruminant Research* 67, 184-191.
- Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Frutos, P., Garcia, U., Ortega-Mora, L.M., Ferreira, L.M., Celaya, R., Ferre, I., 2007b. Anthelmintic and nutritional effects of heather supplementation on Cashmere goats grazing perennial ryegrass-white clover pastures. *Journal of Animal Science* 85, 861-870.
- Paolini, V., Bergeaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2003a. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 113, 253-261.
- Paolini, V., Dorchies, P., Hoste, H., 2003b. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. *Veterinary Record* 152, 600-601.
- Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2003c. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Research* 34, 331-339.
- Paolini, V., 2004. Effets des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux chez la chèvre. Doctorat de l' Université de Perpignan, France (p 146).
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, 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.



- Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005a. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 127, 277-283.
- Paolini, V., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005b. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third-stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. *The Veterinary Journal* 170, 260-263.
- Pattra, A.K., 2007. Nutritional management in organic livestock farming for improved ruminant health and production-an overview. *Livestock Research Rural Development*, volume 19 (3), Article #41 Retrieved from <http://www.lrrd.org/lrrd19/3/patr19041.htm>.
- Pell, A.N., Woolston, T.K., Nelson, K.E., Schofield, P., 1999. Tannins: biological activity and bacterial tolerance. In: *Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings of International Workshop*, 92, 111-116, Brooker, (Ed.), Canberra, Australia.
- Plumlee, K.H., Johnson, B., Galey, F.D., 1998. Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 10, 263-267.
- Pomroy, W.E., Whelan, N., Alexander, A.M., West, D.W., Stafford, K., Adlington, B.A., Calder, S.M., 1992. Multiple resistance in goat-derived *Ostertagia* and the efficacy of moxidectin and combinations of other anthelmintics. *New Zealand Veterinary Journal* 40, 76-78.
- Pomroy, W.E., 2006. Anthelmintic resistance in New Zealand: A perspective on recent findings and options for the future. *New Zealand Veterinary Journal* 54, 265-270.
- 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-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., Vernhet, A., 2006. Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* 20, 687-697.
- Prichard, R., 1994. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 54, 259-268.
- Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, D.J., Martin, I.C.A., Donald, A.D., 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal* 56, 239-250.
- Prieur, C., rigaud, J., Cheynier, V., Outounet, M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36, 781-784.
- Rabel, B., McGregor, R., Douch, P.G.C., 1994. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International Journal for Parasitology* 24, 671-676.
- Rahman, W.A., Collins, G.H., 1990a. The establishment and development of *Trichostrongylus colubriformis* in goats. *Veterinary Parasitology* 35, 195-200.
- Rahman, W.A., Collins, G.H., 1990b. Changes in liveweight gain, blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. *British Veterinary Journal* 146, 543-550.

- Ramírez-Restrepo, C.A., Barry, T.N., Pomroy, W.E., Lopez-Villalobos, N., McNabb, W.C., Kemp, P.D., 2005a. Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase summer lamb growth under commercial dryland farming conditions with minimal anthelmintic drench input. *Animal Feed Science and Technology* 122, 197-217.
- Ramírez-Restrepo, C.A., Barry, T.N., 2005b. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 120, 179-201.
- Reed, J.D., 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science* 73, 1516-1528.
- Regos, I., Treutter, D., 2010. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Chromatography A* 1217, 6169-6177.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E., 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly beverages (coffee, cacao, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3438-3442.
- Rios-de Alvarez, L., Greer, A.W., Jackson, F., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J.F., 2008. The effect of dietary sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on local cellular responses to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Parasitology* 135, 1117-1124.
- Rocha, R.A., Bresciani, K.D.S., Barros, T.F.M., Fernandes, L.H., Silva, M.B., Amarante, A.F.T., 2008. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. *Small Ruminant Research* 75, 135-143.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R., 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69, 299-322.
- Rogers, W.P., Sommerville, R.I., 1963. The infective stage of nematode parasites and its significance in parasitism. *Advances in Parasitology* 1, 109-171.
- Rogers, W.P., Sommerville, R.I., 1968. The infectious process and its relation to the development of early parasitic stages of nematodes. *Advances in Parasitology* 6, 327-348.
- Rogers, W.P., 1982. Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. *International Journal for Parasitology* 12, 495-502.
- Rogosic, J., Estell, R.E., Ivankovic, S., Kezic, J., Razov, J., 2008. Potential mechanisms to increase shrub intake and performance of small ruminants in mediterranean shrubby ecosystems. *Small Ruminant Research* 74, 1-15.
- Rojas, D.K., López, J., Tejada, I., Vázquez, V., Shimada, A., Sánchez, D., Ibarra, F., 2006. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. *Animal Feed Science and Technology* 128, 218-228.
- Sager, H., Hosking, B., Bapst, B., Stein, P., Vanhoff, K., Kaminsky, R., 2009. Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology* 159, 49-54.

- Sansom-Himmelsjerna, G.V., 2007a. Mode of action of current anthelmintic drug classes, In: Anthelmintics and resistance: a review Novartis (Ed.), Switzerland, pp. 23-27.
- Sansom-Himmelsjerna, G.V., 2007b. Mechanisms of resistance to anthelmintics in nematodes, In: Anthelmintics resistance: a review, Novartis (Ed.), Switzerland, pp. 28-33.
- Sangster, N.C., Gill, J., 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology Today* 15, 141-146.
- Scharenberg, A., Heckendorn, F., Arrigo, Y., Hertzberg, H., Gutzwiller, A., Hess, D.H., Kreuzer, M., Dohme, F., 2008. Nitrogen and mineral balance of lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and fed tanniferous sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Journal of Animal Science* 86, 1879-1890.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 91, 21-40.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology* 139, 150-157.
- Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J.F., Chartier, C., Cabaret, J., 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary Research* 33, 465-480.
- Singh, B., Bhat, T.K., Sharma, O.P., 2001. Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal system. *Livestock Production Science* 68, 259-262.
- Smith, M.C., Sherman, D.M., 1994. *Goat Medicine*. Lea & Febiger, Baltimore, USA (p 825).
- Smith, W.D., Smith, S.K., Murray, J.M., 1994. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunology* 16 231-241.
- Smith, W.D., Zarlenga, D.S., 2006. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology* 139, 347-359.
- Smith, W.D., 2008. Recent vaccine related studies with economically important gastrointestinal nematode parasites of ruminants. *Tropical Biomedicine* 25, 50-55.
- Sokerya, S., Waller, P.J., Try, P., Hoglund, J., 2009. The effect of long-term feeding of fresh and ensiled cassava (*Manihot esculenta*) foliage on gastrointestinal nematode infections in goats. *Tropical Animal Health and Production* 41, 251-258.
- Sommerville, R.I., Rogers, W.P., 1987. The nature and action of host signals. *Advances in Parasitology* 26, 239-293.
- Song, J.M., Lee, K.H., Seong, B.L., 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research* 68, 66-74.
- Song, J.H., Kim, S.-K., Chang, K.-W., Han, S.K., Yi, H.K., Jeon, J.G., 2006. *In vitro* inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives of Oral Biology* 51, 1131-1140.

- Steppek, G., Behnke, J.M., Buttle, D.J., Duce, I.R., 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends in Parasitology* 20, 322-327.
- Streit, W., Fengel, D., 1994. Purified tannins from quebracho colorado. *Phytochemistry* 36, 481-484.
- Stromberg, B.E., Gasbarre, L.C., 2006. Gastrointestinal nematode control programs with an emphasis on cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food animal practice* 22, 543-565.
- Suarez, V.H., Cristel, S.L., 2007. Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. *Veterinary Parasitology* 144, 111-117.
- Sykes, A.R., Coop, R.L., 1976. Food intake and utilization by growing lambs with parasitic damage to the abomasum or small intestine. *Proceedings of the Nutrition Society* 35, 13A-14A.
- Sykes, A.R., Coop, R.L., 1977. Intake and utilization of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. *Journal of Agricultural Science* 88, 671-677.
- Symons, L.E.A., Hennessy, D.R., 1981. Cholecystokinin and anorexia in sheep infected by the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology* 11, 55-58.
- Taylor, M.A., 1990. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. *Research in Veterinary Science* 49, 198-202.
- Terrill, T.H., Douglas, G.B., Foote, A.G., Purchas, R.W., Wilson, G.F., BARRY, T.N., 1992a. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *The Journal of Agriculture Science* 199, 265-273.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., 1992b. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58, 321-329.
- Terrill, T.H., Waghorn, G.C., Woolley, D.J., McNabb, W.C., Barry, T.N., 1994. Assay and digestion of <sup>14</sup>C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *British Journal of Nutrition* 72, 467-477.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, D., Burke, J.M., Muir, J.P., Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Veterinary Parasitology* 146, 117-122.
- Terrill, T.H., Dykes, G.S., Shaik, S.A., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Burke, J.M., Mosjidis, J.A., 2009. Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: Dose titration study. *Veterinary Parasitology* 163, 52-56.
- Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., Larsen, M., 1999. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Veterinary Parasitology* 84, 169-186.

- Thamsborg, S.M., Mejer, H., Bandier, M., Larsen, M., 2003. Influence of different forages on gastrointestinal nematode infections in grazing lambs. In: The 19th International Conferences of WAAVP, New Orleans, USA, pp. 189.
- Theodoridou, K., Aufrère, J., Andueza, D., Pourrat, J., Le Morvan, A., Stringano, E., Mueller-Harvey, I., Baumont, R., 2010. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 160, 23-38.
- Theodorou, M.K., Barahona, R., Kingston-Smith, A., Sanchez, S., Lascano, C., Owen, E., Morris, C., 1999. News perspectives on the degradation of plant biomass in the rumen in the absence and presence of condensed tannins. In: Brooker, J.D. (Ed). *Tannins in livestock and human nutrition : ACIAR Proceedings*, Canberra, Australia.
- Tiemann, T.T., Franco, L.H., Ramírez, G., Kreuzer, M., Lascano, C.E., Hess, H.D., 2010. Influence of cultivation site and fertilisation on the properties of condensed tannins and *in vitro* ruminal nutrient degradation of *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla* and *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology* 157, 30-40.
- Torres-Acosta, J.F., 1999. Supplementary feeding and the control of gastrointestinal nematodes of goats in Yucatan. The Royal Veterinary College. University of London, Mexico (p 269).
- Torres-Acosta, J.F., Jacobs, D.E., Aguilar-Caballero, A., Sandoval-Castro, C., May-Martinez, M., Cob-Galera, L.A., 2004. The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology* 124, 217-238.
- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research* 77, 159-173.
- Tort, J., Brindley, P.J., Knox, D., Wolfe, K.H., Dalton, J.P., J.R. Baker, R.M., Rollinson, D., 1999. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. *Advances in Parasitology* Vol. 43, Academic Press, pp. 161-266.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2005. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. *International Journal for Parasitology* 35, 329-335.
- Tzamaloukas, O., Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Huntley, J.F., Coles, F., 2006. The effect of chicory (*Cichorium intybus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on larval development and mucosal cell responses of growing lambs challenged with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology* 132, 419-426.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., 1996. *Veterinary Parasitology*, 2<sup>nd</sup> ed., Oxford, UK, Blackwell Science Ltd., 224-234.
- Valderrábano, J., Calvete, C., Uriarte, J., 2010. Effect of feeding bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb faeces. *Veterinary Parasitology* 172, 89-94.

- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., van Rensburg, L.J., Oberem, P.T., Allan, M.J., 1997. Quality control in generic anthelmintics: Is it adequate? *Veterinary Parasitology* 72, 157-165.
- Veneziano, V., Rinaldi, L., Caputo, A.R., Fedele, V., Gringoli, G., 2007. Effects of gastrointestinal strongyle parasitism on milk quality. In: the quality of goat products (IGA-CRA, Ed.), Bella, Italy, pp. 142-145.
- Waghorn, G., Ulyatt, M.J., John, A., Fisher, M.T., 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. *British Journal of Nutrition* 57, 115-126.
- Waghorn, G., McNabb, W.C., 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 62, 383-392.
- Waghorn, G., 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147, 116-139.
- Waghorn, T.S., Molan, A.L., Deighton, M., Alexander, R.A., Leathwick, D.M., McNabb, W.C., Meagher, L.P., 2006. *In vivo* anthelmintic activity of *Dorycnium rectum* and grape seed extract against *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 54, 21-27.
- Waller, P.J., 1997. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 72, 391-412.
- Waller, P.J., Bernes, G., Thamsborg, S.M., Sukura, A., Richter, S.H., Ingebrigtsen, K., Höglund, J., 2001. Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic countries: Historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. *Acta Veterinaria Scandinavica* 42, 31-44.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004. Nematode control in „green’ ruminant production systems. *Trends in Parasitology* 20, 493-497.
- Waller, P.J., 2006. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology* 139, 1-14.
- Wang, P.X., Ueberschär, K.H., 1990. The estimation of vicine, convicine and condensed tannins in 22 varieties of fababeans (*Vicia faba* L.). *Animal Feed Science and Technology* 31, 157-165.
- Wardhaugh, G.K., Rodriguez-Menendez, H., 1988. The effects of the antiparasitic drug, ivermectin, on the development and survival of the dung-breeding fly, *Orthelia cornicina* (F.) and the scarabaeine dung beetles, *Copris hispanus* L., *Bubas bubalus* (Oliver) and *Onitis belial* F. *Journal of Applied Entomology* 106, 381-389.
- Waterman, P.G., 1999. The tannins - an overview. In : Tannins in livestock and human nutrition: ACIAR Proceedings of International Workshop, p 10–13, Brooker, (Ed.), Adelaide, Australia.
- Weisshaar, B., Jenkins, G.L., 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion Plant Biology* 1, 251-257.



- Williams, J.C., 1997. Anthelmintic treatment strategies: current status and future. *Veterinary Parasitology* 72, 461-477.
- Windon, R.G., 1996. Genetic control of resistance to helminths in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54, 245-254.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., Samson-Himmelstjerna, G.V., Sangster, N.C., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20, 469-476.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruyse, J., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology* 58, 181-213.
- Woodward, A., Coppock, D.L., 1995. Role of plant defense in the utilization of native browse in southern Ethiopia. *Agroforestry Systems* 32, 147-161.
- Yamaguchi, K., Honda, M., Ikigai, H., Hara, Y., Shimamura, T., 2002. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin gallate on the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research* 53, 19-34.
- Yan, F., Xu, L., Liu, L., Yan, R., Song, X., Li, X., 2010. Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal* 185, 174-179.
- Yatsuda, P.A., Krijgsveld, J., Cornelissen, W.C.A.A., Heck, J.R.A., Vries, E., 2003. Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 16941-16951.
- Yue, C., Coles, G.C., Blake, N., 2003. Multiresistant nematodes on a Devon farm. *Veterinary Record* 153, 604.
- Zhu, J., Filippich, L.J., MT, A.L., 1992. Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Research in Veterinary Science* 53, 280-292.
- Zimmer, N., Cordesse, R., 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Productions Animales* 9, 167-179.