

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX	5
LISTE DES FIGURES	7
ABRÉVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
PREMIÈRE PARTIE : CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. Filière petits ruminants au Yucatán et contexte nématodes gastro-intestinaux.....	13
1.1. Présentation générale du Yucatán, place de l'élevage des petits ruminants et systèmes de production	13
1.2. Les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants	15
1.2.1. Généralités	15
1.2.2. Cycle biologique.....	16
1.2.3. Épidémiologie.....	17
1.2.4. Conséquences chez les petits ruminants.....	18
2. Contrôle des nématodes gastro-intestinaux.....	19
2.1. Anthelminthiques de synthèse.....	19
2.1.1. Classification	19
2.1.2. Limites d'utilisation : le phénomène préoccupant de la résistance aux anthelminthiques.....	20
2.1.3. Récentes avancées de la recherche et de l'industrie pharmaceutique	23
2.1.4. Prévention de l'apparition des résistances aux anthelminthiques	24
2.2. Méthodes alternatives aux anthelminthiques de synthèse.....	25
2.2.1. Augmenter la résistance ou la résilience de l'hôte	26
2.2.2. Tarir la source d'infestation de l'hôte	27
2.2.3. Éliminer les nématodes gastro-intestinaux au sein de l'hôte.....	28

2.3. Exemples d'approches intégrées du contrôle	29
3. Les tanins	30
3.1. Définition et généralités	30
3.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques	32
3.3. Classification biochimique	32
3.4. Sources de tanins, localisation et variation de la teneur dans la plante	34
3.5. Effets chez les petits ruminants	36
3.5.1. Effets des tanins hydrolysables	36
3.5.2. Effets des tanins condensés	36
3.6. Effets sur les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants	38
3.6.1. Études <i>in vitro</i>	39
3.6.2. Études <i>in vivo</i>	41
3.6.3. Variabilité des effets des tanins condensés	45
3.6.4. Modes d'action des tanins condensés	45
4. Le marc de café comme source atypique de tanins condensés	46
4.1. Importance du marc de café dans le monde et au Mexique	46
4.2. Composition phénolique du marc de café	46
4.3. Études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur la valorisation potentielle du marc de café dans l'alimentation des ruminants	47
4.4. Étude <i>in vitro</i> sur les propriétés anthelminthiques du marc de café	48
DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE <i>IN VITRO</i>	49
1. Objectif général	49
2. Objectifs spécifiques	49
3. Matériel et méthodes	50
3.1. Matériel biologique	50
3.2. Obtention du marc de café sec	50
3.3. Obtention des extraits tanniques de marc de café	50

3.4. Quantification des composés polyphénoliques et de l'activité biologique	51
3.4.1. Méthode de Folin-Ciocalteu	51
3.4.2. Test de la vanilline-HCl.....	51
3.4.3. Test de diffusion radiale	51
3.5. Mesure de l'activité anthelminthique <i>in vitro</i>	52
3.5.1. Infestation expérimentale	52
3.5.2. Collecte des œufs de <i>Haemonchus contortus</i>	52
3.5.3. Test d'éclosion des œufs.....	52
3.6. Analyses statistiques (test d'éclosion des œufs)	53
4. Résultats.....	54
4.1. Collection d'extraits tanniques de marc de café.....	54
4.2. Composés phénoliques et activité biologique des extraits de marc de café.....	55
4.3. Test d'éclosion des œufs	56
5. Discussion	57
5.1. Composés phénoliques et activité biologique des extraits de marc de café.....	57
5.2. Test d'éclosion des œufs	58
TROISIÈME PARTIE : ÉTUDE <i>IN VIVO</i>.....	61
1. Objectif général.....	61
2. Objectifs spécifiques	61
3. Matériel et méthodes	62
3.1. Zone d'étude.....	62
3.2. Aliments utilisés.....	62
3.3. Analyses bromatologique, chimique et biologique	62
3.4. Animaux et groupes expérimentaux.....	63
3.5. Mesure de la consommation volontaire	63
3.6. Monitoring de l'état général des animaux	63
3.7. Mesure de l'excrétion des œufs de nématodes gastro-intestinaux	63
3.8. Coprocultures, récupération et classification des larves	64
3.9. Analyses statistiques	64

4. Résultats.....	65
4.1. Analyses bromatologique, chimique et biologique	65
4.2. Consommation volontaire et état général des animaux.....	65
4.3. Excrétion des œufs de nématodes gastro-intestinaux et résultats des coprocultures	66
5. Discussion	67
5.1. Analyses bromatologique, chimique et biologique	67
5.2. Consommation volontaire et état général des animaux.....	67
5.3. Excrétion des œufs de nématodes gastro-intestinaux et résultats des coprocultures	68
 CONCLUSION	 71
 BIBLIOGRAPHIE	 73
 ANNEXES	 85
 Annexe 1. Résultats détaillés du test d'éclosion des œufs.	87
Annexe 2. Constitution des groupes selon les données récoltées préalablement au démarrage de l'expérience <i>in vivo</i>	89
Annexe 3. Résultats du suivi de l'excrétion fécale des œufs de nématodes gastro- intestinaux.....	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Production animale au Yucatán	14
Tableau 2. Principales espèces de nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants. 15	
Tableau 3. Principales classes de molécules anthelminthiques utilisées contre les nématodes gastro-intestinaux des ruminants.....	19
Tableau 4. Situation mondiale actuelle de la résistance aux principaux anthelminthiques chez les ruminants et les chevaux	21
Tableau 5. Synthèse des cas publiés de résistance aux anthelminthiques détectée dans les élevages de petits ruminants au Mexique.	22
Tableau 6. Exemples de métabolites secondaires supposés posséder des propriétés anthelminthiques et plantes associées.....	29
Tableau 7. Classification simplifiée des polyphénols chez les végétaux supérieurs.....	31
Tableau 8. Contenu en tanins condensés de différentes plantes fourragères.	34
Tableau 9. Effets des tanins condensés sur la nutrition et les performances zootechniques des petits ruminants en fonction de leur teneur dans la ration.....	36
Tableau 10. Principaux tests <i>in vitro</i> employés pour mesurer l'effet anthelminthique d'extraits de plantes riches en tanins condensés.....	39
Tableau 11. Études <i>in vitro</i> des effets des tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants.....	40
Tableau 12. Effets <i>in vivo</i> de plantes riches en tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants : conditions expérimentales d'infestation	43
Tableau 13. Effets <i>in vivo</i> de plantes riches en tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants : conditions naturelles d'infestation.	44
Tableau 14. Variabilité du rendement, des composés polyphénoliques et de l'activité biologique des huit extraits de marc de café	55
Tableau 15. Variabilité de l'effet <i>in vitro</i> des huit extraits de marc de café sur l'éclosion des œufs de <i>Haemonchus contortus</i>	56
Tableau 16. Composition des suppléments alimentaires employés	62
Tableau 17. Analyses des suppléments utilisés dans l'alimentation des groupes expérimentaux	65
Tableau 18. Évolution du poids des animaux entre le début et la fin de l'expérience ..	65
Tableau 19. Composition générique de la communauté de larves de nématodes gastro-intestinaux écloses et observées dans les prélèvements fécaux des caprins en fin d'expérience	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte administrative du Mexique montrant la localisation du Yucatán.....	13
Figure 2. Cycle biologique des nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants.	16
Figure 3. Charte du système FAMACHA®.	24
Figure 4. Cartes des scores utilisées dans le système Five Point Check®.	25
Figure 5. Structures de l'acide gallique et d'un tanin gallique	33
Figure 6. Structures chimiques de base des flavan-3-ols et des tanins condensés	33
Figure 7. Plaque multipuits employée dans le test d'éclosion des œufs.....	53
Figure 8. Collection d'extraits tanniques de huit marcs de café différents.	54

ABRÉVIATIONS

Acide chlorogénique	ACG
Activité biologique	AB
Anthelminthique	ATH
Centimètre	cm
<i>Coffea arabica</i>	<i>C. arabica</i>
Chromatographie liquide à haute performance	HPLC
<i>Haemonchus contortus</i>	<i>H. contortus</i>
Heure	h
Kilogramme	kg
Larves infestantes	L ₃
Litre	L
Mètre	m
Microgramme	µg
Milligramme	mg
Millilitre	mL
Matière sèche	MS
Métabolites secondaires des plantes	MSP
Nématodes gastro-intestinaux	NGI
<i>Oesophagostomum colombianum</i>	<i>O. colombianum</i>
Œufs par gramme	OPG
Petits ruminants	PR
Produit intérieur brut	PIB
Phosphate Buffered Saline	PBS
Phénols totaux	PT
Plantes riches en tanins	PRT
Polyéthylène glycol	PEG
Poids vif	PV
Polyvinyl polypyrrolidone	PVPP
Rotations par minute	rpm
Spent coffee grounds	SPG
Strongles gastro-intestinaux	SGI
Strongles respiratoires	SR
Tanins condensés	TC
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	<i>T. circumcincta</i>
<i>Trychostrongylus colubriformis</i>	<i>T. colubriformis</i>
World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology	WAAVP



INTRODUCTION

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du stage de master 2 " Santé Animale et Épidémiosurveillance dans les Pays du Sud " (ancien Certificat d'Études Approfondies Vétérinaires " Production Animale en Régions Chaudes ") effectué comme année d'approfondissement du cursus vétérinaire. Organisé par le Cirad Montpellier (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) en collaboration avec l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse et l'Université Montpellier 2, ce master à visée professionnalisante m'a permis d'entrer en contact avec le Dr Torres-Acosta, chercheur parasitologiste en charge du département des petits ruminants de la Faculté de Médecine Vétérinaire et de Zootechnie du Yucatán au Mexique, et ainsi de travailler avec lui pendant six mois sur la lutte intégrée contre le parasitisme gastro-intestinal.

D'après la FAO, en 2008 la population mondiale de petits ruminants était estimée à 1 078 millions d'ovins et 862 millions de caprins. La population de ces derniers, par ailleurs communément appelés " bétail des pauvres ", est en augmentation constante de 1 à 4% depuis vingt ans et croît ainsi plus rapidement que celles des bovins et ovins, reflétant son émergence en tant qu'espèce d'élevage majeure. Les PR représentent une source majeure de protéines animales pour les populations à faible revenu dans le monde : les pays en développement sont ainsi responsables de 97 et 83% respectivement de la production mondiale de viande et de lait de chèvre. En plus de pouvoir transformer des aliments de faible qualité en denrées de bonne valeur nutritionnelle pour l'Homme (lait et surtout viande), ils sont adaptés aux conditions environnementales arides, jouent aussi un rôle socioculturel significatif et présentent une facilité de maniement, tout ceci en faisant une alternative de premier choix dans la production des pays tropicaux (Aziz, 2010).

Dans les systèmes de production de petits ruminants au pâturage, les enjeux majeurs sont la nutrition et le parasitisme gastro-intestinal (Torres-Acosta et Hoste, 2008). Ce dernier est responsable de pertes économiques majeures résultant de coûts directs (diminution de la qualité et de la quantité de la production, mortalité) et indirects (associés aux mesures de prévention, diagnostic et traitement). Pendant plus de cinquante ans, les anthelminthiques chimiques ont été la pierre angulaire des programmes de contrôle des nématodes gastro-intestinaux. Le développement rapide conséquent et la prévalence désormais mondiale de la résistance aux anthelminthiques au sein des populations de nématodes (Kaplan, 2004) ont souligné la nécessité de développer des alternatives aux anthelminthiques de synthèse, ainsi qu'une approche plus durable et intégrée du contrôle (Jackson et Coop, 2000).

Parmi les solutions proposées, une attention particulière a été portée sur les plantes dites riches en tanins. En effet, en plus de constituer une source potentiellement importante de nutriments (notamment de protéines) pour les ruminants, de nombreuses expériences *in vivo* et *in vitro* ont démontré leur effet anthelminthique sur les principales espèces de nématodes gastro-intestinaux, en particulier *Haemonchus contortus* (Hoste *et al.*, 2006 ; Hoste et Torres-Acosta, 2011). Le plus souvent, ces effets ont été attribués aux tanins condensés, des métabolites secondaires très répandus dans le

règne végétal et synthétisés notamment par la plante comme mécanisme de défense en réponse aux agressions extérieures (Jean-Blain, 1998).

Ainsi parmi les plantes riches en tanins condensés, la plupart des études se sont focalisées sur les légumineuses fourragères, essentiellement des régions tempérées au départ même si aujourd'hui l'attention est également marquée pour les espèces tropicales (Hoste *et al.*, 2008 ; Alonso-Díaz *et al.*, 2010b). Paradoxalement, la littérature scientifique est pauvre en études s'intéressant à l'éventuelle activité anthelminthiques de sous-produits agroindustriels et de plantes habituellement non utilisées dans l'alimentation des ruminants. À ce sujet, nos prédécesseurs Nieves-Guerrero *et al.* (2009) ont rapporté des résultats prometteurs récemment obtenus en laboratoire sur la migration des larves de *Haemonchus contortus* avec un extrait de marc de café (*Coffea arabica*) contenant 4,5% de tanins condensés. Par ailleurs les découvertes de Calderon-Quintal *et al.* (2010), en suggérant une adaptation possible (et logiquement attendue selon la théorie évolutionniste de la Reine Rouge développée par Van Allen en 1973) des parasites soumis à un environnement substantiel en tanins, modulent le succès des plantes riches en ces composés et soulignent l'intérêt d'investiguer les sources atypiques de tanins naturellement absents de l'alimentation des animaux.

Étant donné l'importance du café dans l'économie mondiale et mexicaine, dans cette étude il fut choisi de poursuivre les recherches exclusivement avec ce dernier, et plus précisément avec le sous-produit de l'or vert qu'est le marc résiduel du café une fois extrait à l'eau chaude et dont pratiquement aucun usage n'est fait si ce n'est dans des systèmes de compost, la plus grande partie étant toutefois généralement incinérée. Les analyses bromatologiques ont par ailleurs montré que ce matériel contient environ 12-14% protéines, 20% lipides, 40-60% cellulose brute, et qu'il pourrait être par conséquent une source possible de nutriments dans l'alimentation des ruminants (Xu *et al.*, 2007).

Les hypothèses formulées préalablement au démarrage de l'étude furent les suivantes :

- ✓ de manière similaire à ce qu'on observe chez les plantes riches en tanins condensés, il existe au sein de l'espèce *Coffea arabica* une variabilité dans le contenu en tanins, l'activité biologique et l'effet antiparasitaire. Or la caractérisation de cette variabilité est une étape nécessaire dans la validation scientifique de l'usage d'une plante bioactive comme anthelminthique naturel (Hoste *et al.*, 2008),

- ✓ les petits ruminants peuvent consommer volontairement un aliment incluant un niveau conséquent de marc de café et ainsi tirer profit de ses propriétés anthelminthiques. En effet, la confirmation des résultats *in vitro* par une étape ultérieure *in vivo* est également requise et importante, toujours dans cette même perspective d'une recherche d'alternatives aux anthelminthiques chimiques (Hoste *et al.*, 2008).

Dans un premier temps, le contexte bibliographique du travail de recherche est présenté. Les deux parties suivantes du mémoire correspondent à la partie expérimentale de l'étude et exposent successivement les expériences menées en conditions *in vitro* et *in vivo*.

PREMIÈRE PARTIE : CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Filière petits ruminants au Yucatán et contexte nématodes gastro-intestinaux

1.1. Présentation générale du Yucatán, place de l'élevage des petits ruminants et systèmes de production

Le Yucatán est l'un des 31 états qui composent la république fédérale du Mexique. Il est localisé au Sud-Est de ce dernier et au Nord de la péninsule du même nom (figure 1), qui est par ailleurs une vaste plate-forme calcaire dont l'altitude maximale dépasse à peine les 200 m et dont le réseau hydrographique est essentiellement souterrain. Cette particularité, associée à un climat majoritairement tropical chaud subhumide, font ainsi du *Mundo Maya* un pays particulièrement sec en surface. Il est délimité au Nord par le Golfe du Mexique, au Sud-Est par l'état de Quintana Roo et au Sud-Ouest par l'état de Campeche. Subdivisé en 106 municipalités, il a une superficie de 39 612 km² et une population de 1,96 millions d'habitants, dont 16% est rurale et 42% vit dans la capitale Mérida.

Figure 1. Carte administrative du Mexique montrant la localisation du Yucatán.



(source : Encyclopaedia Universalis)

Étant donné la pauvreté nutritionnelle des sols et la pratique du système de cultures plurielles qu'est la *milpa* (2-3 ans de cultures suivies d'une longue période de 8 à 20 ans de jachère), 26,6% seulement des terres sont utilisées pour l'agriculture. Si le secteur de l'agro-élevage et de la pêche ne participe que pour 4,4% au PIB de l'état en 2009, loin derrière ceux des services, du commerce et de l'industrie manufacturière, il garde cependant une grande importance économique et socioculturelle à l'échelle locale, la culture du maïs, haricot, potiron, henequen, la production de miel et la pêche étant ainsi des activités pratiquées traditionnellement par les Mayas. Horticulture maraîchère (concombre, pastèque, chile, soja, tomate), arboriculture fruitière (agrumes, papaye, avocat, noix de coco) et sylviculture (cèdre) se sont d'autre part développées avec succès. Les élevages avicole, porcin et bovin sont désormais des secteurs dynamiques qui occupent une place prépondérante dans la production de viande (respectivement 50,4, 36,8 et 12,4% de la production étatale en 2010). L'élevage des petits ruminants (PR) est quant à lui secondaire, relativement récent et encore trop faiblement valorisé, associé de manière générale à des niveaux de technicité et de productivité faibles (tableau 1).

Tableau 1. Production animale au Yucatán.

Type de produit	Volume (milliers de tonnes) (2010)	Nombre d'animaux (milliers de têtes) (2007)	Unités de production (milliers) (2007)
Viande de volaille	125,4	14 904	59,6
Viande de porc	91,4	242	20,9
Viande bovine	30,9	409	16,2
Viande ovine	0,9	95	0,6
Viande caprine	-	5	0,6
Oeufs	69,3	-	-
Miel	6,3	-	11,0
Lait (vache)	3,4	-	-
Pêche	34,0	-	-

(source : INEGI)

Du fait d'une forte demande de viande de mouton et d'agneau provenant du centre du pays (avec près de 23 millions d'habitants, l'aire urbaine de la capitale Mexico est en effet la deuxième plus peuplée du monde après Tokyo), l'élevage ovin connaît actuellement un essor appréciable : le nombre d'exploitations est en augmentation constante et on observe des changements dans les systèmes et objectifs de production, autoconsommation et épargne étant peu à peu remplacées par des systèmes d'entreprise plus rentables. Pelibuey, Black Belly et Criollo (issue de croisements variés, rustique et bien adaptée localement) sont les races prédominantes. Cependant les fermes commerciales de plusieurs centaines de bêtes restent largement minoritaires, près de 80% des élevages étant de petite taille et comptant moins de 50 brebis (Parsons *et al.*, 2006). Le système de production caprin reste quant à lui de type subsistance : les Criollo sont conduits dans des systèmes extensifs et semi-intensifs (pâturage associé à un supplément alimentaire distribué en stabulations rudimentaires), les élevages comportant en moyenne une quinzaine d'animaux destinés à la production de viande (Torres-Acosta *et al.*, 2003c).

1.2. Les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants

1.2.1. Généralités

Les nématodes gastro-intestinaux (NGI) sont des vers ronds non segmentés parasites du tractus digestif. Les plus prévalents appartiennent à l'ordre des Strongylida et sont communément appelés strongles gastro-intestinaux ou strongles digestifs en médecine vétérinaire.

En zones tempérées, les deux espèces de première importance sont *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis*. Quant aux zones tropicales, les principaux genres d'intérêt affectant les élevages de petits ruminants exploitant le pâturage sont *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. et *Oesophagostomum* spp. (tableau 2). L'espèce *Haemonchus contortus* est très pathogène et particulièrement prévalente dans ces régions. Les genres *Cooperia* spp. et *Chabertia* spp. y sont également rencontrés, dans une moindre mesure cependant. Les strongyloses sont souvent mixtes, plusieurs espèces pouvant ainsi affecter divers segments du tractus digestif.

Tableau 2. Principales espèces de nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants.

Famille	Espèce	Localisation chez l'hôte
Trichostrongylidae	<i>Haemonchus. contortus</i>	Abomasum
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Intestin grêle
Strongylidae	<i>Oesophagostomum columbianum</i>	Gros intestin
	<i>Oesophagostomum venulosum</i>	

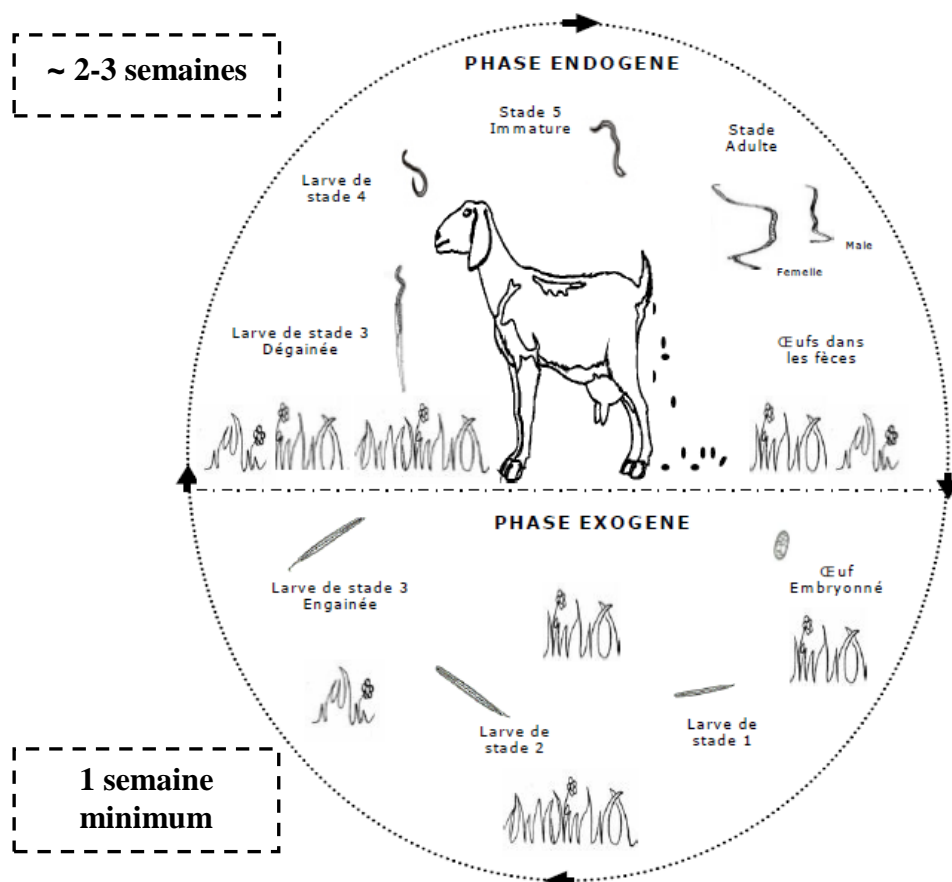
1.2.2. Cycle biologique

Le cycle est monoxène (un seul hôte) et comprend deux phases (figure 2) :

✓ une phase libre ou exogène dans le milieu extérieur : elle commence avec la ponte des vers adultes femelles et l'excrétion des œufs dans les fèces. Dans des conditions de température et d'humidité favorables, les œufs s'embryonnent et éclosent, libérant des larves 1 qui vont évoluer en l'espace de quelques jours jusqu'à devenir des larves infestantes (L_3). Ces dernières possèdent une gaine leur conférant une durée de survie sur pâturage très variable selon les conditions climatiques et l'espèce en question (par exemple 3-4 semaines en moyenne dans le cas de *Haemonchus spp.* en zones tropicales, *Teladorsagia spp.* pouvant survivre 6-12 mois en zones tempérées),

✓ une phase parasitaire ou endogène dans l'hôte : elle commence avec l'ingestion des L_3 par l'hôte lors du pâturage. Après s'être rapidement et activement libérées de leur gaine dans la lumière du tractus digestif (sous l'influence de stimuli tels que CO_2 , pH et température), elles peuvent pénétrer dans la muqueuse digestive et y muer en larves 4. Ces dernières, avant de passer au stade adulte mature et se féconder, s'enkystent fréquemment lors de longues périodes sèches défavorables : c'est le phénomène de l'hypobiose larvaire et elles reprendront leur développement lors de la saison des pluies suivante. La période prépatente, correspondant au temps écoulé entre l'ingestion des L_3 et l'excrétion des œufs, dure en général 2 à 3 semaines chez la plupart des espèces parasites des petits ruminants (en l'absence d'hypobiose).

Figure 2. Cycle biologique des nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants.



(source : Brunet, 2008)

1.2.3. Épidémiologie

On observe des fluctuations saisonnières des infestations, avec en zones tropicales un pic d'infestation après la reprise de la saison des pluies à l'issue d'une longue saison sèche, l'humidité élevée et les températures étant alors propices à l'éclosion des œufs et au développement des L₃.

L'importance de l'infestivité du pâturage (c.à.d. sa contamination par les L₃) dépend :

- ✓ du niveau d'excrétion des œufs (*H. contortus* par exemple est particulièrement prolifique avec 5 000-10 000 œufs par femelle et par jour, contre quelques centaines seulement pour *T. colubriformis* et *T. circumcincta*),

- ✓ des conditions d'oxygénation, d'humidité et de température qui vont influencer sur l'éclosion, le développement et la survie des larves (températures et pourcentages d'humidité optimaux étant compris entre 23 et 28°C, 60 et 70% respectivement),

- ✓ du niveau de chargement et de la durée d'exploitation des parcelles par les animaux.

L'importance de l'infestation des petits ruminants dépend :

- ✓ du comportement alimentaire de l'hôte : les ovins qui ont un comportement de brouteur inféodé à l'herbe présentent ainsi un risque d'infestation supérieur par rapport aux caprins présentant en plus un comportement de cueilleur exploitant les plantes arbustives,

- ✓ de la résistance de l'hôte (aptitude à développer et à maintenir une réponse immunitaire) : les jeunes animaux sont ainsi plus sensibles et réceptifs que les adultes, de même que les animaux avec de meilleurs niveaux de production. Les caprins sont d'autre part plus réceptifs que les ovins, bovins. En permettant de couvrir dans l'ordre ses besoins et priorités métaboliques, quantité et qualité de la ration influent également sur la capacité de l'hôte à acquérir puis exprimer son immunité. Autour de la mise-bas existe le phénomène du *periparturient rise*, avec l'observation de pics d'excrétion fécale des œufs (ils correspondent en fait à un relâchement immunitaire dû à l'augmentation des besoins des femelles),

- ✓ de la résilience de l'hôte (aptitude à supporter les effets pathologiques du parasitisme et à maintenir sa production).

1.2.4. Conséquences chez les petits ruminants

La gravité de ces conséquences dépend avant tout du niveau d'infestation de l'hôte. D'autres facteurs influent également et sont liés aux nématodes (tels que la nature ou le nombre d'espèces présentes dans les divers organes digestifs) ou à l'hôte (tels que l'espèce, l'âge ou la malnutrition).

Les nématodes perturbent la physiologie digestive et entraînent une réorientation des métabolismes protéique et énergétique. En conséquence, l'évolution des strongyloses gastro-intestinales se fait généralement sur un mode chronique avec une expression subclinique correspondant surtout à des retards de croissance chez les jeunes animaux, à des pertes de production et des altérations de la qualité de la viande, du lait et de la laine chez les adultes. Cependant des infestations massives d'animaux sensibles peuvent entraîner une manifestation clinique avec apparition de symptômes pour la plupart non spécifiques conduisant parfois jusqu'à la mort : baisse d'appétit pouvant aller jusqu'à l'anorexie, amaigrissement, asthénie, diarrhée profuse et incoercible. Dans le cas de nématodes hématophages comme *H. contortus*, les spoliations sanguines modérées mais répétées permettent d'observer une anémie et un œdème de l'auge (signe de la " bouteille ") plus caractéristiques. À l'autopsie, des lésions de gastrite catarrhale, œdémateuse ou chronique sont retrouvées. Les lésions sont plus discrètes au niveau de l'intestin grêle dont la paroi peut parfois être épaissie. Enfin des nodules de taille et de couleur variables sont observés au niveau du gros intestin.

Les vers présents dans les différents segments du tractus digestif causent en effet des lésions au niveau des épithéliums : modifications des cellules glandulaires et réduction de la densité de cellules pariétales sécrétrices d'HCl dans l'abomasum, abrasion des villosités et altération sévère des entérocytes dans l'intestin. Ces modifications structurales vont par la suite avoir d'importantes répercussions fonctionnelles : augmentation du pH gastrique entraînant une moindre efficacité de l'activation du pepsinogène en pepsine, altération de la perméabilité épithéliale et des activités enzymatiques intestinales, modification du péristaltisme et des hormones peptidiques gastro-intestinales (cholécystokinine, gastrine). Les résultats d'une telle perturbation des structures et fonctions digestives sont évidemment une diminution de l'ingestion, une maldigestion des aliments et une malabsorption des nutriments. En parallèle de cette diminution des apports nutritionnels, la présence des vers augmente les besoins de l'hôte pour maintenir l'homéostasie sanguine, l'intégrité des épithéliums digestifs et développer une réponse immunitaire : en conséquence les nutriments sont réquisitionnés vers les sites endommagés, ceci au détriment des sites habituels de synthèse (muscle, mamelle, follicule pileux), ce qui accroît encore les pertes de production. Une forte perturbation des métabolismes, en particulier celui des protéines, résulte ainsi du parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux.

Les mécanismes pathogéniques expliquant ces perturbations physiopathologiques sont, en plus de la spoliation directe du chyme alimentaire, des tissus pariétaux ou des vaisseaux sanguins de l'hôte, d'une part l'effet mécanique abrasif de la fixation des nématodes aux épithéliums digestifs, d'autre part la libération dans leur environnement de produits d'excrétion/sécrétion au rôle encore mal connu et de nature biochimique variée (dont des protéines présentant une activité enzymatique, par exemple des protéases, acétylcholinestérases et hyaluronidases), certains étant toxiques pour les cellules de l'hôte.

2. Contrôle des nématodes gastro-intestinaux

2.1. Anthelminthiques de synthèse

2.1.1. Classification

Les anthelminthiques (ATH) chimiques utilisés en médecine vétérinaire chez les ruminants peuvent être classés en différentes grandes familles selon leur mode d'action (tableau 3).

Tableau 3. Principales classes de molécules anthelminthiques utilisées contre les nématodes gastro-intestinaux des ruminants (d'après Brunet, 2008).

Famille	Représentants	Spectre d'activité	Cible d'action
Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles	Thiabendazole	SGI	β -tubuline des microtubules (cellules intestinales et tégumentaires)
	Mébandazole	SGI	
	Oxfendazole	SGI / SR	
	Fébanfel	SGI / SR	
	Fenbendazole	SGI / SR	
	Nétobimin	SGI / SR / Douve	
	Albendazole	SGI / SR / Douve	
Imidazothiazoles et Tétrahydropyrimidines	Lévamisole Pyrantel Morantel	SGI / SR	Récepteurs nicotiniques à acétylcholine (cellules neuromusculaires)
Lactones macrocycliques (avermectines et milbémycines)	Ivermectine Abamectine Doramectine Éprinomectine Moxidectine	SGI / SR Insectes Acariens	Récepteurs ionotropiques du glutamate (canaux ioniques Cl ⁻ des cellules neuromusculaires du pharynx)
Salicylanilides*	Closantel Nitroxinil	Douve Strongles hématophages	Phosphorylation oxydative

SGI : strongles gastro-intestinaux

SR : strongles respiratoires.

** leur spectre d'activité contre les strongles digestifs étant étroit, leur rôle dans la lutte contre ces derniers reste secondaire par rapport à leur activité douvicide.*

2.1.2. Limites d'utilisation : le phénomène préoccupant de la résistance aux anthelminthiques

En plus de l'écotoxicité potentielle de certaines lactones macrocycliques liée à la présence des résidus dans les matières fécales, des restrictions d'emploi lors de la lactation (seuls certains benzimidazoles sont en effet autorisés à cause des résidus éliminés dans le lait) ou en production " Agriculture Biologique " (volonté de limitation des intrants chimiques), se pose le problème désormais mondial de la résistance aux anthelminthiques.

Une population résistante aux anthelminthiques est définie comme une population ayant génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d'ATH habituellement létales pour des individus de cette espèce (Sanger et Gill, 1999). Le mécanisme mis en cause est l'apparition de mutations génétiques et l'échappement à la pression de sélection avec une diffusion d'allèles de résistance au sein de populations issues de vers ayant survécu au traitement (Jackson et Coop, 2000). Les facteurs liés à l'activité humaine et favorisant le développement de résistances sont le sous-dosage (ceci concerne notamment les caprins pour lesquels la biodisponibilité est plus faible du fait d'une pharmacocinétique particulière du médicament dans cette espèce), l'emploi fréquent et répété de la même classe d'ATH, le traitement systématique de tous les animaux au sein d'un même troupeau et l'absence résultante de refuge (c.à.d. une proportion de nématodes sensibles au sein de la population totale) (Wolstenholme *et al.*, 2004).

Les premiers cas de résistance à des nématocides large spectre ont été décrits dans les années 60 avec l'emploi des benzimidazoles, initialement chez les ovins avec *H. contortus*, ceci quelques années seulement après la mise sur le marché de leur chef de file le thiabendazole. Elle s'est alors rapidement étendue aux autres strongles digestifs majeurs des petits ruminants ainsi que des chevaux, ce même schéma se répétant par la suite dans les années 70, 80 et 90 avec l'introduction des imidazothiazoles-tétrahydropyrimidines, des avermectines puis des milbémycines : les premiers rapports confirmant l'apparition de résistances à ces nouvelles classes d'ATH furent en effet publiés moins de dix ans après l'autorisation du lévamisole, de l'ivermectine et de la moxidectine. À l'heure actuelle, des résistances multiples aux trois classes majeures d'ATH ont été signalées sur les cinq continents pour les espèces *H. contortus*, *T. colubriformis* et *T. circumcincta*, menaçant ainsi à l'échelle mondiale la viabilité de l'élevage des petits ruminants (Kaplan, 2004). Bien qu'elle ait été documentée au départ principalement chez les ovins et les caprins, et que le problème fut longtemps considéré comme négligeable chez les bovins, récemment elle a été de plus en plus communément décrite également chez ces derniers (tableau 4).

Tableau 4. Situation mondiale actuelle de la résistance aux principaux anthelminthiques chez les ruminants et les chevaux (Kaplan, 2004).

ATH	Espèces hôtes à résistance élevée*	Espèces hôtes à résistance émergente**	Principales régions d'élevage où l'ATH est encore hautement efficace chez les PR et les chevaux
Benzimidazoles	PR, chevaux	bovins	aucune
Lévamisole (ruminants)	PR	bovins	aucune
Pyrantel (chevaux)	chevaux (États-Unis uniquement)	chevaux	inconnu
Ivermectine	ruminants	bovins, chevaux	chevaux - monde PR - Europe, Canada
Moxidectine	caprins	ruminants, chevaux	chevaux - monde ovins - plupart des régions

* définie par un niveau et une prévalence suffisants pour rendre l'utilisation du médicament incertaine sans vérification préalable de son efficacité.

** définie comme une situation où la résistance est rapportée mais la prévalence est inconnue et le niveau et la distribution ne sont pas considérés comme posant de sérieux problèmes.

Ainsi dans certains pays d'Amérique Latine comme le Brésil, l'Argentine, l'Uruguay et le Paraguay, des situations de résistances multiples à toutes les molécules commercialisées ont même été jusqu'à conduire à la disparition des élevages dans ces régions (FAO, 2003). Des cas de résistance ont également été rapportés au Mexique et en particulier au Yucatán, principalement aux benzimidazoles et au lévamisole mais également à l'ivermectine (tableau 5).

Tableau 5. Synthèse des cas publiés de résistance aux anthelminthiques détectée dans les élevages de petits ruminants au Mexique.

ATH testé	Genres de NGI rencontrés	Nombre d'élevages touchés	Espèce hôte concernée	Région d'étude	Référence
Benzimidazole	<i>Haemonchus sp.</i>	16% de 38*	Ovins	Sud-Est	Torres-Acosta <i>et al.</i> , 2003a
	<i>Haemonchus sp.</i>	12*	Ovins	Sud-Est	Torres-Acosta <i>et al.</i> , 2003b
	<i>Haemonchus sp.</i>	1	Caprins	Sud-Est	Torres-Acosta <i>et al.</i> , 2003c
	<i>Haemonchus sp.</i> <i>Trichostrongylus sp.</i> <i>Oesophagostomum sp.</i>	58% de 19	Caprins	Sud-Est	Torres-Acosta <i>et al.</i> , 2005
Lévamisole	<i>Haemonchus sp.</i> <i>Trichostrongylus sp.</i> <i>Oesophagostomum sp.</i>	12	Ovins	Sud-Est	Torres-Acosta <i>et al.</i> , 2003b
	<i>Trichostrongylus sp.</i> <i>Oesophagostomum sp.</i>	1	Caprins	Sud-Est	Torres-Acosta <i>et al.</i> , 2003c
Ivermectine	<i>Haemonchus sp.</i> <i>Oesophagostomum sp.</i> <i>Ostertagia sp.</i> <i>Trichostrongylus sp.</i>	1	Ovins	Sud-Est	González-Garduño <i>et al.</i> , 2003
	<i>Haemonchus sp.</i> <i>Teladorsagia sp.</i>	5% de 20	Ovins	Nord-Ouest	Montalvo-Aguilar <i>et al.</i> , 2006

* suspicion de résistance multiple aux benzimidazoles et aux lactones macrocycliques.

2.1.3. Récentes avancées de la recherche et de l'industrie pharmaceutique

Depuis l'apparition des lactones macrocycliques, les investissements dans la recherche et le développement de nouveaux anthelminthiques se sont considérablement réduits : en effet, alors qu'une nouvelle classe pharmacologique voyait jusque-là le jour chaque décennie depuis les années 50 et la phénothiazine, par la suite plus aucune nouvelle molécule ne fut introduite sur le marché durant plus de 25 ans. Ce n'est que très récemment que des découvertes inédites ont été réalisées dans le domaine de la lutte chimique contre les helminthes.

Le monépantel ou AAD-1566, introduit en 2009 sur le marché sous le nom de Zolvix® (Novartis Animal Health Inc.), est le premier composé développé appartenant à une nouvelle classe d'anthelminthiques, les dérivés d'aminoacétonitrile (Kaminsky *et al.*, 2008a,b). Il active les récepteurs nicotiniques à acétylcholine de type DEG-3 spécifiques des nématodes, ce qui lui confère un mode d'action complètement nouveau. Le second, appelé derquantel, est aussi connu sous le nom de 2-désoxoparاهرquamide ou PNU-141962 et est commercialisé depuis 2010 dans une formulation le combinant avec l'abamectine (Startect®, Pfizer Animal Health). C'est un dérivé semi-synthétique membre de la classe des spiroindoles : antagonistes des récepteurs nicotiniques à acétylcholine, ils bloquent la transmission neuromusculaire cholinergique conduisant ainsi à une paralysie flasque des nématodes (Lee *et al.*, 2002). Ces deux nouveaux traitements vermifuges, s'ils ne sont pour le moment enregistrés qu'en Nouvelle-Zélande, ont démontré une excellente efficacité sur la plupart des NGI d'importance économique chez les ovins, y compris sur les souches multirésistantes aux autres groupes d'antiparasitaires (Hosking *et al.*, 2010 ; Little *et al.*, 2011).

Une autre classe a également fait son entrée en scène ces dernières années, celle des cyclooctadepsipeptides. Le PF1022A, son membre naturel, est un produit de fermentation isolé du champignon *Mycelia sterilia* appartenant à la microflore de la plante *Camellia japonica*. L'émodepside, dérivé semi-synthétique de ce dernier, est déjà commercialisé par Bayer Animal Health GmbH sous les dénominations Profender® et Procox®, médicaments antiparasitaires pour chiens et/ou chats. Tous deux ont montré un large spectre d'activité contre les nématodes gastro-intestinaux majeurs des animaux de compagnie et d'élevage et doivent encore faire l'objet d'études avant d'être autorisés à être mis sur le marché de ces derniers. Leur cible d'action seraient des récepteurs de type latrophiline situés dans le pharynx des strongles, permettant ainsi d'inhiber l'aspiration pharyngée (Harder *et al.*, 2003).

Si ces avancées majeures apportent un soulagement certain et justifié aux éleveurs, elles ne doivent cependant pas faire perdre de vue qu'un usage raisonné de ces nouvelles molécules apparaît désormais absolument nécessaire. Le danger serait en effet de reproduire les erreurs du passé en se reposant une fois de plus sur l'emploi démesuré des nouveaux traitements " miracles ", ce qui conduirait inéluctablement en quelques années à la sélection et à la diffusion de souches résistantes. D'autre part, le coût significativement élevé de ces nouveaux produits ainsi que leur accessibilité les rendent difficiles à intégrer en routine dans les programmes de contrôle, ceci étant particulièrement vrai dans les pays en développement. D'où le consensus suivant qui est actuellement en train de s'imposer au sein de la communauté scientifique : la lutte chimique seule n'était pas viable et est arrivée à son terme, un contrôle durable du parasitisme nécessitant désormais une approche intégrée combinant des solutions basées sur différents principes d'action (Hoste et Torres-Acosta, 2011).

2.1.4. Prévention de l'apparition des résistances aux anthelminthiques

Afin de retarder l'apparition de nouvelles résistances et de préserver les anthelminthiques encore efficaces, il est devenu nécessaire de faire une utilisation plus rationnelle de ces molécules, en prenant notamment le contre-pied des erreurs de conduite du passé identifiées comme propices à la diffusion des résistances. Ainsi, l'alternance annuelle de familles d'ATH présentant des modes d'action différents sur les vers (Barnes *et al.*, 1995), l'application de doses adaptées à l'espèce et au poids de l'animal (Wolstenholme *et al.*, 2004), et le traitement sélectif ciblé des animaux les plus exposés au risque parasitaire (Kenyon *et al.*, 2009) permettraient de réduire la pression de sélection sur les populations de nématodes et de ralentir le développement de résistances vis-à-vis des différents ATH.

L'identification et le traitement ciblé de ces 20% d'animaux responsables de 80% de l'excrétion parasitaire (c.à.d. principalement les jeunes et les femelles hautes productrices ou en première lactation) peut s'effectuer au moyen de systèmes de comptage des œufs par gramme (OPG) de fèces, d'attribution de scores de diarrhée, d'évaluation de la condition corporelle ou de changement de poids vif (PV) dans les systèmes de production où prédominent les parasites non hématophages (Torres-Acosta *et al.*, 2009). Concernant le cas particulièrement préoccupant de l'haemonchose, la méthode FAMACHA® a été mise point et se base sur l'évaluation clinique de l'anémie qui est mesurée par examen des muqueuses conjonctives (figure 3) : l'intensité de pâleur de ces dernières permet d'attribuer un score d'anémie qui présente une très bonne corrélation avec le niveau d'infestation de l'animal (van Wyk et Bath, 2002 ; Vatta *et al.*, 2001). Développé initialement en Afrique du Sud, le système a été largement testé et validé depuis, la charte étant désormais disponible en six langues et distribuée à l'échelle mondiale. Son utilisation simple, rapide et économique en fait un outil précieux notamment en zones tropicales où sévit *H. contortus* (Mahieu *et al.*, 2007).

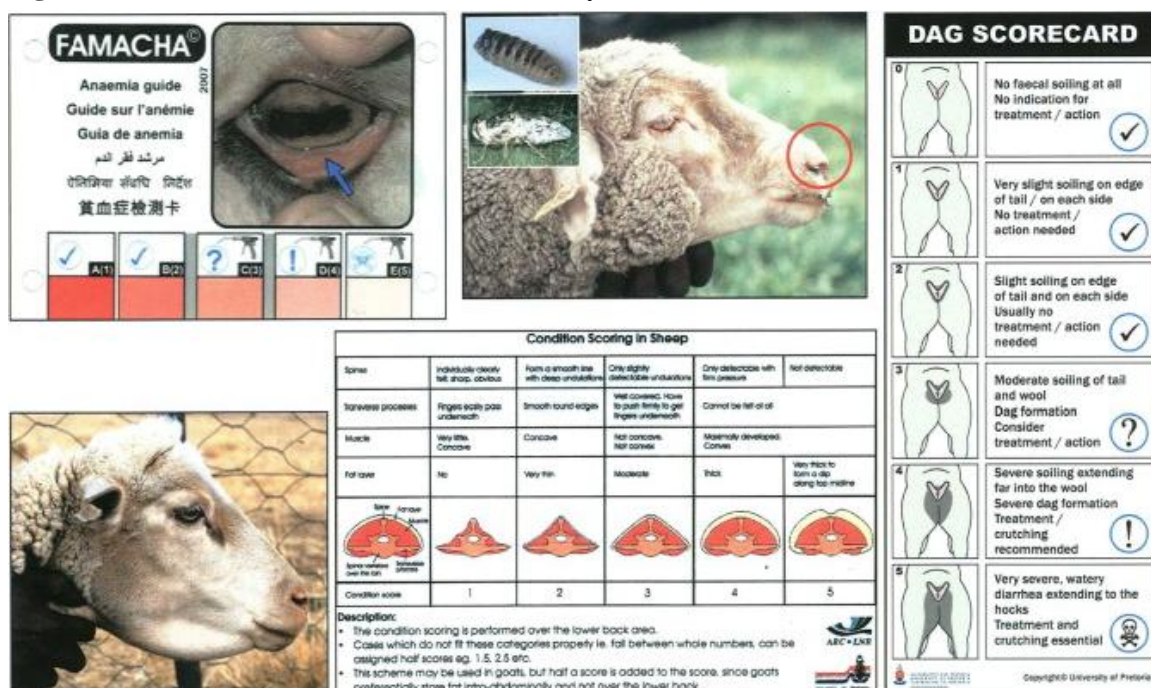
Figure 3. Charte du système FAMACHA®.



(source : NCR-SARE)

Une autre application pratique du principe de traitement sélectif ciblé (en anglais *targeted selective treatment* ou TST) est le système Five Point Check[®] récemment proposé par Bath et van Wyk (2009) : cette fois-ci les auteurs détaillent de manière plus importante l'examen clinique et rajoutent aux scores d'anémie, de condition corporelle et de diarrhée précédemment évoqués le jetage nasal (pour *Oestrus ovis*) et l'œdème sous-mandibulaire (pour les vers hématophages) (figure 4). Associant un guide d'utilisation pratique à l'usage des éleveurs sur le terrain, il a la volonté d'étendre le système FAMACHA[®] à d'autres endoparasites majeurs des petits ruminants. Enfin, il est intéressant de noter que les points de contrôle employés dans le traitement ciblé sont également des marqueurs phénotypiques de résilience qui peuvent être directement utilisés par les éleveurs afin d'identifier et de ne garder que les animaux parvenant à maintenir de bonnes performances avec peu de traitements.

Figure 4. Cartes des scores utilisées dans le système Five Point Check[®].



(source : Bath et van Wyk, 2009)

2.2. Méthodes alternatives aux anthelminthiques de synthèse

Elles reposent sur trois principaux axes de lutte visant à :

- 1) stimuler la réponse de l'hôte par la vaccination, la sélection génétique ou l'immunonutrition,
- 2) diminuer le contact entre hôtes sensibles et stade parasite infestant par la gestion du pâturage et la maîtrise de son infestivité,
- 3) éliminer les vers au sein de l'hôte par l'emploi de substances végétales ou minérales possédant des propriétés anthelminthiques.

Il faut bien comprendre ici qu'il ne s'agit plus d'éradiquer les nématodes sur le court terme en se reposant uniquement sur les traitements chimiques, ni de se passer complètement de ces derniers. L'objectif du contrôle intégré est de choisir et de combiner différents outils adaptés au contexte épidémiologique local, ceci afin de diminuer de façon optimale l'impact négatif des parasites sur la production, la santé et le bien-être des ruminants (Hoste et Torres-Acosta, 2011).

2.2.1. Augmenter la résistance ou la résilience de l'hôte

Diverses solutions ont été proposées, les plus prometteuses faisant actuellement l'objet de recherches approfondies :

✓ vaccination contre des antigènes parasitaires cachés. Cette approche a d'abord été appliquée dans la recherche sur les tiques, permettant même de commercialiser avec succès deux vaccins contre *Boophilus microplus*, TickGard™ et Gavac™. À ce jour, les essais de vaccin utilisant des antigènes internes de la paroi intestinale et ayant conféré la meilleure protection contre *H. contortus* (l'espèce la plus étudiée en raison de sa fréquence et de son pouvoir pathogène) ont été réalisés avec les glycoprotéines membranaires des microvillosités H11 and H-gal-GP. Les anticorps produits par l'hôte immunisé sont ingérés par le nématode lors de son repas sanguin et viennent perturber les fonctions digestives des protéines de la bordure en brosse, compromettant ainsi la survie du parasite. Malgré des résultats prometteurs, la production d'un vaccin recombinant à partir de ces antigènes et la protection croisée vis-à-vis d'autres espèces de nématodes demeurent cependant des freins non négligeables à cette stratégie de vaccination (Smith et Zarlenga, 2006),

✓ identification de marqueurs phénotypiques (hématocrite et taux d'anticorps ont parfois été retenus, les OPG restant le critère le plus fréquemment utilisé) et moléculaires dans le but de sélectionner les animaux génétiquement résistants (Hunt *et al.*, 2008). Divers programmes de sélection ont en effet montré une diminution de l'excrétion fécale parasitaire et de la contamination des pâtures après plusieurs générations. Cependant l'augmentation de la résistance de l'hôte a probablement un coût et pourrait se faire au détriment de ses capacités de réponse aux infections par d'autres groupes de pathogènes (c.à.d. bactéries, virus ou protozoaires) ou de ses performances de production (Jacquet *et al.*, 2009),

✓ amélioration de la ration alimentaire de l'hôte afin d'apporter les nutriments limitants (en général les protéines) et ainsi couvrir les besoins supplémentaires associés au parasitisme. Elle peut se faire par supplémentation protéique ou énergétique selon le facteur limitant identifié, l'idéal étant d'utiliser les ressources alimentaires disponibles localement et valorisables à faible coût. Cette dernière stratégie s'avère particulièrement pertinente dans les régions tropicales où les animaux sont couramment en situation de stress nutritionnel du fait de la limitation des ressources notamment lors de la saison sèche (Knox *et al.*, 2006). Ainsi au Yucatán, où les ruminants ont accès à une végétation où prédominent arbres et buissons légumineux riches en protéines, Torres-Acosta *et al.* (2004, 2006) ont montré qu'une supplémentation en énergie (100g/j d'un mélange soja-sorgho 26%:74%) permettait d'augmenter la résilience de chevreaux Criollo à l'infection naturelle par les nématodes gastro-intestinaux.

2.2.2. Tarir la source d'infestation de l'hôte (Torres-Acosta et Hoste, 2008)

Un nombre varié de techniques ont été suggérées et reposent sur trois grandes stratégies que sont l'évasion (transférer des animaux traités de pâtures contaminées vers des pâtures exemptes de L₃), la prévention (mettre des animaux sains sur des pâtures propres) et la dilution de l'infestivité du pâturage :

✓ rotation des parcelles : la mise au repos prolongée du pâturage permet, en attendant la mort naturelle des L₃, de l'assainir avant la réintroduction des animaux. Étant donné la durée de survie parfois très longue des L₃ en zones tempérées, cette méthode s'avère être une option particulièrement pertinente en conditions chaudes et humides,

✓ diminution de la densité animale, mélange d'animaux d'âges différents ayant des niveaux distincts de sensibilité au parasitisme, ou encore pâturage mixte alterné ou simultané de deux espèces animales présentant des spécificités différentes vis-à-vis des espèces de nématodes (par exemple ruminants/chevaux), ont également été décrits comme méthodes de dilution,

✓ décontamination active des pâturages par épandage de substances chimiques (chaux), application de certaines pratiques culturales (labour, brûlage maîtrisé) ou contrôle biologique par des champignons nématophages (spores de *Duddingtonia flagrans*). Concernant cette dernière méthode, bien qu'aient été prouvées son efficacité (les spores ingérées sont en effet capables de survivre dans le tractus digestif de l'hôte pour ensuite coloniser et tuer les larves de nématodes présentes dans les fèces) et sa sûreté d'emploi (aucune conséquence néfaste pour la faune du sol n'a été mise en évidence jusqu'ici), un certain nombre de contraintes technologiques et économiques demeurent néanmoins et ne permettent pas encore d'envisager sa commercialisation et son application en élevage (Ojeda-Robertos *et al.*, 2009).

Récemment ont été développés plusieurs logiciels de simulation comme outils d'aide à la décision sur le terrain. La collecte de données précises et complètes sur les pratiques d'élevage et le planning de pâturage de l'exploitation ont pour but d'identifier les périodes critiques avec risques d'infection parasitaire. À partir de là, ils permettent de trouver une stratégie de prévention adaptée à la situation épidémiologique locale et répondant aux questions pratiques de l'éleveur. Cette stratégie va combiner l'emploi de traitement(s) ATH (quand traiter ? qui ? à quelle fréquence ? avec quelle molécule et quel mode d'administration ?) et la modification du système de pâturage (quand et sur quelles parcelles déplacer les animaux ?). De tels logiciels sont d'ores-et-déjà disponibles en ligne en Australie et en France : Wormboss (<http://tools.wool.com/WormBoss/LivePage.aspx?pageId=905>) et Parasit'Info (<http://www.parasitinfo.com/ParasitInfo/login.jsf> ; Chauvin et Vermesse, 2009) respectivement. Le modèle anglais décrit et proposé par Learmount *et al.* (2006) utilise quant à lui le logiciel de modélisation de systèmes dynamiques STELLA®. Enfin l'équivalent néo-zélandais Wormwise® est actuellement en cours de développement (<http://www.beeflambnz.com/farm/tools-resources>). Ces modèles informatiques sont toutefois complexes car ils impliquent de bien connaître les conditions écologiques influençant la biologie (c.à.d. le développement, la survie et le pouvoir infectieux) et les dynamiques d'infestation des L₃ (O'Connor *et al.*, 2006) ; pour autant leur potentiel de praticité et d'efficacité demande encore à être validé sur le terrain.

2.2.3. Éliminer les nématodes gastro-intestinaux au sein de l'hôte

Là encore différentes méthodes sont actuellement à l'étude :

✓ administration orale de capsules contenant des aiguilles d'oxyde de cuivre (COPINOX[®]) libérés sous l'effet du pH acide régnant dans l'abomasum. Malgré le risque concomitant d'intoxication de l'hôte, un mécanisme d'action encore mal compris et un spectre d'activité étroit excluant notamment les espèces intestinales, elle a largement démontré son efficacité anthelminthique sur *H. contortus* chez les petits ruminants et limiterait l'installation des L₃ et la reproduction des vers adultes (Hale *et al.*, 2007),

✓ plantes bioactives aux propriétés anthelminthiques. Utilisées pourtant par l'Homme partout et de tout temps, ces ressources naturelles sont soumises à un intérêt renouvelé depuis une vingtaine d'années, trois raisons principales expliquant ce phénomène : l'émergence et la diffusion constantes et ubiquitaires de populations de nématodes résistantes aux ATH chimiques ; la difficulté d'accès des petits éleveurs aux traitements dans de nombreux pays en développement ; dans les pays développés notamment, la préoccupation publique croissante pour les résidus présents dans les produits de consommation et la tendance résultante à la création de systèmes de production plus " verts " diminuant les intrants chimiques (Hoste *et al.*, 2006). En médecine vétérinaire, deux modes d'utilisation de ces plantes peuvent être envisagés : sous la forme de médicaments phytothérapeutiques ou de nutricaments. Les premiers, appelés également plantes médicinales, sont issus de l'ethnomédecine traditionnelle (connaissance empirique d'utilisation de la pharmacopée locale) ; ils consistent en des remèdes préparés à base de plantes et appliqués aux animaux dans un but curatif, à court terme. Les nutricaments, encore appelés produits nutraceutiques ou alicaments, sont des plantes dont l'exploitation traditionnelle pour l'alimentation animale est aujourd'hui associée à des propriétés bénéfiques sur la santé au-delà de leur seule valeur nutritive. Elles sont incorporées à plus long terme dans la ration, dans un but généralement préventif, sous forme fraîche souvent (fourrage) ou conservée (foin, ensilage, extraits de plantes). Les avantages de l'exploitation de telles plantes sont le faible coût par rapport aux molécules de synthèse, la disponibilité des ressources et l'absence théorique de résistance des nématodes à leurs principes actifs. Le principal facteur limitant la validation scientifique de leurs propriétés antiparasitaires est le manque d'information sur leurs composés actifs, leurs mécanismes d'action, leur toxicité potentielle et les facteurs influençant leur efficacité, ainsi que sur l'impact écologique éventuel de leur surexploitation (Hoste *et al.*, 2008).

Ainsi, la recherche sur les effets anthelminthiques des plantes a permis de confirmer l'intérêt de remèdes à base d'ail, d'Aloe vera ou d'armoise annuelle, mais également d'identifier des nutricaments potentiels tels que la papaye, les feuilles de manioc, la chicorée et certaines légumineuses. Ces propriétés sont majoritairement attribuées aux métabolites secondaires de ces plantes, les tanins condensés étant actuellement les composés les plus étudiés (tableau 6) (Hoste et Torres-Acosta, 2011). Ainsi, de nombreux travaux ont montré que les plantes riches en tanins condensés (PRT), notamment certaines légumineuses fourragères, pouvaient être employées comme nutricaments et représentaient une alternative prometteuse aux anthelminthiques chimiques (Hoste *et al.*, 2006). Cette application particulière des tanins sera développée plus en détail dans le chapitre suivant.

Tableau 6. Exemples de métabolites secondaires supposés posséder des propriétés anthelminthiques et plantes associées (d'après Brunet, 2008).

Molécules actives suspectées	Nom des plantes
Cystéine-protéinases	<i>Carica papaya</i> (Papaye)
Alcaloïdes	<i>Azadirachta indica</i> (Margousier ou neem)
Lactones sesquiterpéniques	<i>Cichorium intybus</i> (Chicorée) <i>Artemisia annua</i> (Armoise annuelle)
Triterpènes / Alcaloïdes	<i>Calotropis procera</i> (Pommier de Sodome)
Anthraquinones	<i>Terminalia glaucescens</i> (Badamier glauque) <i>Aloe barbadensis</i> (Aloe vera)
Saponines / Hétérosides	<i>Tribulus terrestris</i> (Croix-de-Malte) <i>Allium sativum</i> (Ail)
Tanins condensés	<i>Manihot esculenta</i> (Manioc) Fabaceae (Légumineuses)

2.3. Exemples d'approches intégrées du contrôle

L'intégration de différents outils de contrôle est une tâche complexe à mettre en pratique, tant sur le plan de la recherche (elle nécessite en effet un nombre conséquent de groupes expérimentaux de taille suffisante) que de son application à l'échelle de l'élevage (qui doit être soigneusement adaptée aux conditions locales et aux attentes de l'éleveur). Le concept étant d'autre part récent, à ce jour le nombre d'études rapportant l'essai combiné de plusieurs méthodes reste limité :

✓ de bons résultats ont été obtenus chez des agneaux infectés par *H. contortus* en associant l'oxyde de cuivre à un supplément alimentaire maïs-soja (Burke *et al.* 2004) ou au contrôle biologique par *Duddingtonia flagrans* (Burke *et al.*, 2005),

✓ Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.* (2007) ont également eu un effet positif en utilisant l'oxyde de cuivre et un supplément alimentaire sorgho-soja (74%:26%) chez des chevreaux en conditions d'infestation naturelle,

✓ la supplémentation de moutons avec des blocs multinutritionnels (son de blé 52%, mélasse 40%, farine de soja 5,3%, urée 2,6%) contenant des spores de *Duddingtonia flagrans* présente le double avantage d'améliorer la ration des animaux tout en diminuant la population larvaire de *H. contortus* dans les fèces (Casillas-Aguilar *et al.*, 2008),

✓ enfin chez des brebis infectées avec *T. circumcincta*, les travaux de Kidane *et al.* (2010) associant supplémentation protéique et effets nutraceutiques de la chicorée ont permis d'observer une amélioration des performances de croissance de leurs agneaux ainsi qu'une diminution du parasitisme des animaux.

3. Les tanins

3.1. Définition et généralités

Le terme " tanin " (ou tannin) vient du mot *tannage*, un procédé datant du Moyen Âge et permettant la formation de cuir imputrescible par la création de liaisons entre les fibres de collagène de la peau fraîche et les molécules de tanins alors extraits d'écorces de chêne ou de châtaigner (Bruneton, 2009).

Les tanins font partie des métabolites secondaires des plantes supérieures (MSP) : classés en composés azotés (dont les alcaloïdes), terpénoïdes et composés phénoliques, et à la différence des métabolites primaires intervenant directement dans la nutrition et la croissance (acides aminés et nucléiques, lipides et sucres), les MSP eux participent à la vie de relation de la plante. La synthèse des tanins est ainsi un des mécanismes de défense contre les agressions des phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (insectes, mammifères herbivores).

Les tanins peuvent être actuellement définis comme des composés phénoliques (ou polyphénols) de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Daltons (Haslam, 1989). Ces derniers forment une vaste famille de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau aromatique associé à un ou plusieurs groupements hydroxyles phénoliques. Pour plus de clarté par la suite, ils sont présentés sommairement dans le tableau 7.

Tableau 7. Classification simplifiée des polyphénols chez les végétaux supérieurs.
(d'après Farah et Donangelo, 2006)

Classes et sous-classes		Exemples (remarques)
<i>Non flavonoïdes</i>		
Phénols simples		résorcinol
Acides phénoliques	a. hydroxybenzoïques	acide gallique, acide vanillique (vanilline=aldéhyde), acide salicylique
	a. hydroxycinnamiques	acide caféique, acide férulique, acide paracoumarique
Tanins hydrolysables	Gallotanins	acide tannique
	Ellagitanins	
	Tanins complexes	
Stilbénoloïdes		
Lignanes		(unités de base des lignines)
<i>Flavonoïdes</i>		
Flavones		
Isoflavones		
Flavonols		quercétol (rutine=hétéroside)
Flavanones		
Flavan-3-ols		catéchols, gallocatéchols (monomères des TC)
Flavan-3,4-diols		(impliqués dans la formation des TC)
Tanins condensés (TC, proanthocyanidols)		procyanidols, prodelphinidols
Anthocyanidols		(produits de dégradation des TC à chaud en milieu acide)
Anthocyanes		(hétérosides des anthocyanidols)

3.2. Propriétés physico-chimiques et biologiques

La solubilité des tanins dans l'eau dépend de leur poids moléculaire et de leur degré de polymérisation. Ils sont également solubles dans l'acétone et les alcools, c'est pourquoi l'optimum de rendement de leur extraction est généralement obtenu par des solutions acétone-eau ou méthanol-eau.

La structure chimique des tanins présente de nombreux groupements hydroxyles et phénoliques, ce qui leur confère la propriété particulière de former des complexes avec de nombreuses macromolécules : les acides nucléiques, les ions métalliques ferriques et cuivriques, ainsi que la quasi-totalité des protéines (surtout celles riches en acides aminés hydrophobes comme la proline et l'hydroxyproline).

En conséquence ils possèdent les capacités et propriétés biologiques suivantes : fixation et inhibition enzymatique, piégeage des radicaux libres et activité anti-oxydante, effet antiseptique (antibactérien, antifongique, antiviral), prévention des maladies cardio-vasculaires (ils sont en effet mis en cause dans le populaire *French Paradox* qui existe entre le taux d'infarctus relativement bas et l'alimentation riche en graisses et en vins du Sud-Ouest de la France).

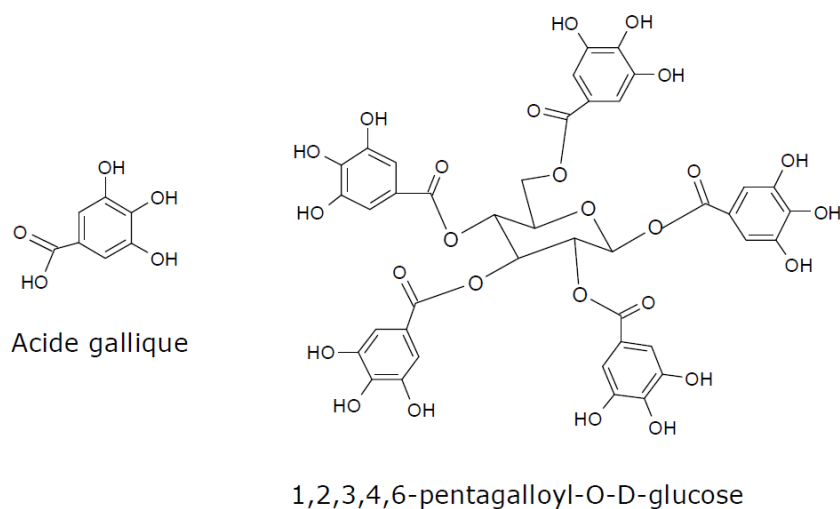
3.3. Classification biochimique

Bien qu'un peu simpliste, la distinction se fait traditionnellement entre tanins hydrolysables et tanins condensés (TC).

Les tanins hydrolysables, comme leur nom l'indique, sont particulièrement sensibles à l'hydrolyse acide et sont répartis en :

- ✓ gallotanins, constitués d'un sucre (en général le glucose) estérifié par un ou plusieurs acides galliques ou dérivés (appelés également unités galloyles) (figure 5),
- ✓ ellagitanins, obtenus à partir des précédents par couplage oxydatif d'au moins deux unités galloyles,
- ✓ tanins complexes (ou tanins partiellement hydrolysables), formés par une unité gallo- ou ellagitanin comportant une liaison glycosidique avec un flavanol.

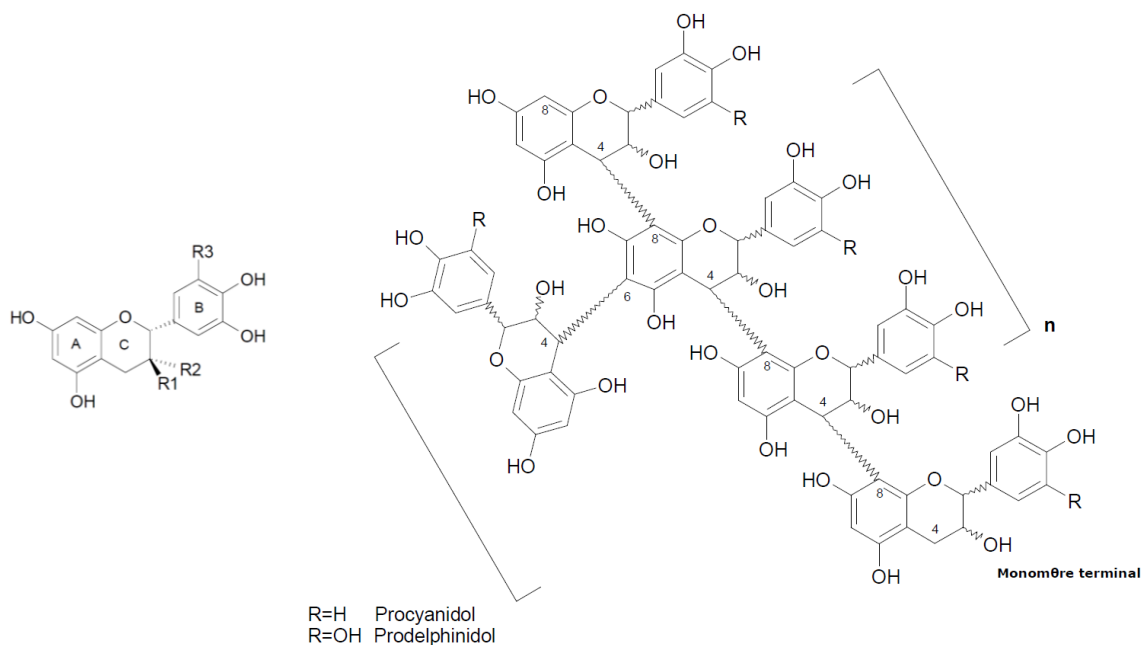
Figure 5. Structures de l'acide gallique et d'un tanin gallique.



(source : Brunet, 2008)

Les tanins condensés ou proanthocyanidols ont en général un poids moléculaire plus élevé et sont des oligomères (2-10 monomères) ou polymères (>10 monomères) de flavan-3-ols reliés majoritairement par des liaisons de type Carbone-Carbone. On distingue quatre groupes principaux, les deux majoritaires étant les procyanidols et les prodelphinidols. Ces derniers se différencient par un groupement OH supplémentaire en position R3 et ont en conséquence une capacité accrue de fixation aux protéines (figure 6).

Figure 6. Structures chimiques de base des flavan-3-ols et des tanins condensés.



(source : Brunet, 2008)

3.4. Sources de tanins, localisation et variation de la teneur dans la plante

Les tanins sont rencontrés de manière extrêmement courante dans le règne végétal, les tanins condensés étant en général plus répandus et abondants dans les plantes que les tanins hydrolysables. En effet à la différence de ces derniers, les tanins condensés se rencontrent non seulement chez les Angiospermes (et plus communément chez les Dicotylédones que chez les Monocotylédones) mais également chez les Gymnospermes. Certaines espèces de Pinaceae (pin), de Fagaceae (chêne et chataîgnier), de Rosidae (acacia) et de Rosaceae (pommier, fraisier) contiennent de fortes quantités de TC (>5% de la MS). Parmi les légumineuses (Fabaceae), certaines espèces fourragères tempérées telles que le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), le sulla (*Hedysarium coronarium*) et les lotiers pédonculé et corniculé (*Lotus pedunculatus* et *L. corniculatus*) contiennent des TC en quantité non négligeable (2 à 5% de la MS). On retrouve également des légumineuses fourragères riches en TC dans les régions tropicales et en particulier au Yucatán, comme le chukum (*Havardia albicans*), le huaxin (*Leucaena leucocephala*), le tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) et certaines espèces du genre *Acacia spp.* En revanche, les plantes herbacées de la famille des graminées (Poaceae) (telles que le ray-grass anglais *Lolium perenne* L.) ou d'autres représentants de la famille des légumineuses comme la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) présentent des quantités très faibles ou non détectables de TC (tableau 8).

Tableau 8. Contenu en tanins condensés de différentes plantes fourragères. (Akkari *et al.*, 2008 ; Alonso-Díaz *et al.*, 2008a,b,c, 2010a ; Barry et McNabb, 1999 ; Brunet *et al.*, 2008b ; Hernández-Orduño *et al.*, 2008 ; Hoste *et al.*, 2006 ; Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*, 2010 ; Min et Hart, 2003).

Plante	TC (% MS)*
Légumineuses tempérées	
<i>Lotus pedunculatus</i> (Lotier pédonculé)	7,7
<i>Lotus corniculatus</i> (Lotier corniculé)	4,8
<i>Onobrychis viciifolia</i> (Sainfoin)	2,5-4,1
<i>Hedysarium coronarium</i> (Sulla)	4,5-8,4
<i>Dorycnium rectum</i> (Dorycnie)	8,7
<i>Lespedeza cuneata</i> (Sericea lespedeza)	4,6-15,2
<i>Medicago sativa</i> L. (Luzerne cultivée)	0,05
Légumineuses tropicales	
<i>Lysiloma latisiliquum</i> (Tzalam)	1,2
<i>Havardia albicans</i> (Chukum)	1,7-7,3
<i>Leucaena leucocephala</i> (Huaxin)	0,8
<i>Piscidia piscipula</i>	0,9
<i>Acacia pennatula</i>	1,6
<i>Acacia gaumeri</i>	1,2-5,4
<i>Acacia cyanophylla</i>	8,2-13,2
Graminées et autres herbacées	
<i>Lolium perenne</i> L. (Ray-grass anglais)	0,2
<i>Chicorium intybus</i> (Chicorée)	0,3

* plusieurs méthodes et standards ont été utilisés afin de doser les tanins condensés ; les chiffres sont donc donnés à titre indicatif et ne sont pas directement comparables.

Chez les végétaux, bien que tous les organes puissent contenir des tanins, leur localisation diffère selon l'organe en question : ainsi les plus fortes concentrations sont mesurées en général dans les fruits, les fleurs, les feuilles, et dérisoirement dans les tiges. Par exemple des mesures effectuées avec le sainfoin ont montré que les feuilles, les fleurs et les tiges contiennent respectivement 0,31%, 0,30% et 0,07% de tanins (Borreani *et al.*, 2003). Au niveau cellulaire, les tanins hydrolysables sont majoritairement présents dans les parois et les espaces intracellulaires, alors que les tanins condensés sont surtout stockés sous forme libre dans les vacuoles (70-80%) et, en proportion variable, sous forme liée aux fibres (lignine) des parois ou aux protéines cellulaires (Terrill *et al.*, 1992).

La teneur et la nature des tanins d'une plante vont également varier en fonction de l'espèce, la variété et le stade végétal (en général lors de la maturation des feuilles et du mûrissement des fruits, la teneur en tanins diminue et le degré de polymérisation augmente), ainsi que des conditions environnementales (la synthèse est généralement augmentée au niveau de la zone menacée en réponse à n'importe quel stress, qu'il soit hydrique, de prédation, etc).

3.5. Effets chez les petits ruminants

3.5.1. Effets des tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables, de par leur sensibilité à l'hydrolyse acide, vont être hydrolysés dans le tractus digestif des ruminants. Leurs produits de dégradation vont alors être rapidement absorbés par la suite et passer dans la circulation sanguine. Or ces métabolites, en plus d'être à l'origine d'ulcérations et de nécroses de l'épithélium digestif, sont hépato- et néphro-toxiques et peuvent être ainsi responsables d'intoxications sévères allant parfois jusqu'à la mort des animaux ingérant des quantités massives de plantes riches en tanins (Mueller-Harvey, 2006).

3.5.2. Effets des tanins condensés

Par le passé, les tanins étaient considérés communément et sans distinction comme des facteurs antinutritionnels ayant un impact négatif sur la santé animale. Désormais le concept majeur évoqué au 16^e siècle par Paracelse cité par Robin (2011) et communément utilisé en toxicologie (" Tout est poison, rien n'est sans poison. Seule la dose fait qu'une chose n'est pas un poison ! ") s'applique également aux tanins condensés, puisqu'il a été montré qu'un apport faible à modéré produit des effets positifs alors que leur ingestion massive aboutit à des effets néfastes sur les paramètres zootechniques, la physiologie digestive et la santé des animaux. À la différence des tanins hydrolysables, les tanins condensés sont toutefois rarement associés à une toxicité aigüe chez les ruminants. On distingue ainsi couramment trois types de conséquences de la consommation de PRT en fonction de leur teneur en tanins condensés (tableau 9). Les effets observés proviennent surtout d'études réalisées sur les espèces *Lotus corniculatus*, *Lotus pedunculatus*, *Hedysarium coronarium*, *Onobrychis viciifolia*, *Lespedeza cuneata* et *Leucaena leucocephala* (légumineuses fourragères) (Mueller-Harvey, 2006 ; Ramírez-Restrepo et Barry, 2005 ; Waghorn et Mc Nabb, 2003).

Tableau 9. Effets des tanins condensés sur la nutrition et les performances zootechniques des petits ruminants en fonction de leur teneur dans la ration. (Brunet, 2008)

Teneur en TC (% MS)	Conséquences	Effets observés
< 2	nulles ou faibles	Prévention du tympanisme Aucun effet sur l'ingestion volontaire
3-6	bénéfiques	↗ absorption nutriments ↗ taux ovulation ↗ production et qualité du lait ↗ production laine ↗ taux de croissance et gain de poids
> 7	néfastes	↘ niveau d'ingestion ↘ absorption nutriments ↘ production lait ↘ production laine ↘ taux de croissance et gain de poids

Au pH ruminal (6-7), les complexes insolubles TC/protéines végétales sont stables, ce qui protège ces dernières des fermentations bactériennes et s'oppose par ailleurs à la production et à l'accumulation de gaz ; leur dissociation ultérieure induit par le pH acide de la caillette permet ainsi une absorption plus élevée d'acides aminés au niveau de l'intestin grêle : c'est le phénomène d'échappement ou *by-pass* ruminal. En revanche, consommés en excès les tanins condensés peuvent réduire l'activité enzymatique de la flore ruminale et interagir avec les protéines membranaires des cellules intestinales, entraînant ainsi une perturbation de la physiologie digestive. Ainsi les équilibres de complexation-dissociation des TC avec les protéines conditionnent largement leurs effets bénéfiques ou néfastes sur la physiologie digestive ; les effets sur la santé et les performances de production découlent alors des modifications engendrées sur digestion.

La réduction de la consommation volontaire de légumineuses fourragères à teneurs élevées en tanins condensés peut s'expliquer notamment par l'astringence (sensation d'assèchement de la bouche) résultant de leur liaison avec les protéines salivaires, en particulier celles riches en proline. Cependant et d'après les résultats de Alonso-Díaz *et al.* (2008c), le niveau d'ingestion de la matière sèche apparaît rester avant tout corrélé au contenu en lignine et en fibre de la ration, la concentration en métabolites secondaires étant un critère secondaire de sélection.

Pour palier aux effets nocifs des tanins condensés, des phénomènes adaptatifs ont été observés chez les petits ruminants : les brouteurs consommant essentiellement des plantes herbacées pauvres en TC, ils développent des stratégies comportementales d'évitement des plantes riches en tanins suite à des expériences individuelles ou des interactions sociales d'apprentissage au sein du groupe. À l'inverse, les cueilleurs consomment en proportion beaucoup plus de plantes ligneuses riches en TC et présentent des adaptations physiologiques (sécrétion de protéines salivaires hautement affines pour les tanins) et anatomiques (glandes salivaires plus développées) (Mc Arthur *et al.*, 1991). Par ailleurs, des procédés d'inactivation des tanins ont été mis au point à titre expérimental, soit par l'administration de polyéthylène glycol (PEG) ou de polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) aux animaux (puissants inhibiteurs des tanins), soit par des traitements chimiques des plantes (hydroxyde de calcium et acide chlorhydrique) (Mueller-Harvey, 2006).

3.6. Effets sur les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants

Les effets des tanins condensés sur le parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants sont abondamment étudiés depuis une vingtaine d'années car la consommation de plantes riches en tanins représente une méthode alternative ou complémentaire à l'emploi des anthelminthiques de synthèse dans la maîtrise de ces parasitoses digestives (Hoste et al., 2008).

L'attention initiale a été portée sur les légumineuses fourragères des régions tempérées, telles les lotiers pédonculé (*Lotus pedunculatus*) et corniculé (*Lotus corniculatus*), le sulla (*Hedysarum coronarium*), le sainfoin (*Onobrychus viciifolia*), la sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) et la dorycnie (*Dorycnium rectum*) (Hoste et al., 2006). Riches notamment en protéines, ces plantes herbacées ont en effet une haute valeur nutritive pour les ruminants. D'autre part, elles sont dépourvues de tanins hydrolysables et présentent des teneurs modérées en tanins condensés (tableau 8), ce qui a permis de suspecter le rôle de ces derniers dans les effets anthelminthiques constatés et également de leur prêter une toxicité limitée.

Plus récemment, des études se sont également intéressées aux propriétés anthelminthiques d'un certain nombre de PRT tropicales : des légumineuses essentiellement telles le huaxin (*Leucaena leucocephala*), le tzalam (*Lysiloma latisiliquum*), le chukum (*Havardia albicans*) et quelques espèces du genre *Acacia spp.*, mais également des plantes appartenant à d'autres familles botaniques comme le fagara (*Zanthoxylum zanthoxyloides*). Ces arbres et arbustes composant le parcours végétatif et l'alimentation naturelle des petits ruminants contiennent généralement des mélanges complexes de tanins condensés, tanins hydrolysables, autres polyphénols et métabolites secondaires : l'identification précise des composés à l'origine des effets observés est par conséquent difficile, ce qui rend l'exploitation rationnelle de ces ressources moins évidente qu'en zones tempérées. Ainsi au Yucatán, diverses études ont été menées *in vitro* et *in vivo* ces dernières années sur les effets anthelminthiques des légumineuses fourragères locales riches en tanins condensés (Alonso-Díaz et al., 2008a,b ; Brunet et al., 2008b ; Martinez-Ortiz-de-Montellano et al., 2010 ; Méndez-Ortíz et al., à paraître).

Enfin certains sous-produits agro-industriels possèdent eux aussi des tanins condensés en concentrations modérées à élevées. Cependant beaucoup reste encore à faire dans ce domaine, la littérature scientifique étant en effet loin d'être aussi abondante sur le sujet qu'en ce qui concerne les plantes fourragères : Nieves-Guerrero et al. (2009) ont ainsi prouvé *in vitro* le rôle inhibiteur des tanins de la coque de cacao (*Theobroma cacao*) et du marc de café (*Coffea arabica*) sur les larves de *H. contortus*. D'autre part, seuls deux sous-produits ont fait l'objet de travaux de recherches assez complets soulignant les effets bénéfiques et le potentiel d'intégration de ces sources atypiques de tanins condensés dans la lutte contre le parasitisme des petits ruminants :

✓ les feuilles de bananier (*Musa × paradisiaca*), une plante tropicale populaire pour ses fruits. Sa capacité à inhiber *in vitro* l'éclosion des œufs de *H. contortus* (Altaf et al., 2011) a été investiguée chez les ovins en conditions expérimentales (Marie-Magdeleine et al., 2010a) et naturelles (Altaf et al., 2011) d'infestation, montrant une réduction significative de l'excrétion parasitaire (tableaux 11, 12 et 13),

✓ les feuilles de manioc (*Manihot esculenta*), un arbuste largement cultivé dans les régions tropicales pour la consommation de ses racines tubérisées. Ses propriétés anthelminthiques démontrées *in vitro* sur les larves de *H. contortus* (Marie-Magdeleine *et al.*, 2010c) ont été attestées *in vivo* lors d'infestations expérimentales d'ovins (Rojas *et al.*, 2006 ; Marie-Magdeleine *et al.*, 2010b) et lors d'une infestation naturelle de caprins (Ho Bunyeth et Preston, 2006) (tableaux 11, 12 et 13).

3.6.1. Études *in vitro*

Les tests *in vitro* utilisés pour déterminer les effets des tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux ont été développés à partir de ceux mis au point pour mesurer l'efficacité des anthelminthiques de synthèse : ils sont présentés de manière résumée dans le tableau 10. Leur interprétation repose sur l'hypothèse d'un effet direct des TC sur les vers. Ils ont pour avantages d'être simples à réaliser, peu coûteux, reproductibles et de ne pas nécessiter l'euthanasie des animaux. Le choix des concentrations d'extraits tanniques à appliquer lors des tests *in vitro* se base sur les gammes de concentrations mesurées dans le liquide ruminal. Les plantes passant avec succès ces tests initiaux de criblage standardisé peuvent être sélectionnées par la suite pour examiner leurs effets *in vivo* (Hoste *et al.*, 2008).

Tableau 10. Principaux tests *in vitro* employés pour mesurer l'effet anthelminthique d'extraits de plantes riches en tanins condensés.

Test	Stades parasitaires ciblés	Processus biologique impliqué
Egg Hatch Assay (EHA)	œufs	éclosion des œufs
Larval Development Assay (LDA)	L ₁ à L ₃	développement larvaire jusqu'au stade infestant
Larval Migration Inhibition Assay (LMI)	L ₃	mobilité des L ₃
Larval Exsheathment Assay (LEA)	L ₃	dégainement des L ₃

De multiples études ont donc été menées *in vitro* pour évaluer l'effet des tanins condensés sur les différents stades parasitaires des principales espèces de nématodes gastro-intestinaux rencontrés chez les petits ruminants, ainsi que pour établir le rôle spécifique des TC dans les effets observés. Selon les cas, elles ont ainsi montré que des extraits totaux de PRT tant tempérées que tropicales permettaient d'inhiber significativement développement, mobilité, dégainement larvaires, ainsi que l'éclosion des œufs de *H. contortus*, *T. circumcincta* et *T. colubriformis*. Dans bon nombre de cas, l'application de PEG ou PVPP inhibiteurs a conduit à annuler les effets initiaux observés, confirmant ainsi largement le rôle majeur des tanins dans l'activité anthelminthique. Enfin le rôle spécifique des tanins condensés a également été établi en employant des extraits de quebracho (*Schinopsis sp.*, bois tropical originaire d'Amérique du Sud et dont l'écorce contient 50-80% de TC), des fractions purifiées de sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) ou des monomères de TC. Le tableau 11 synthétise la démarche et les résultats des études menées en laboratoire.

Tableau 11. Études *in vitro* des effets des tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants.

	Sources de tanins condensés	Espèces de nématodes affectées	Tests <i>in vitro</i> utilisés	Doses testées	Rôle des tanins confirmé	Références
Extraits totaux de plantes						
Légumineuses	<i>Lotus pedunculatus</i>	<i>T. colubriformis</i>	LMI	200-400 µg/mL	oui (PEG)	Molan <i>et al.</i> , 2000
	<i>Lotus corniculatus</i>		EHT, LDA		non	Molan <i>et al.</i> , 2002
	<i>Onobrychis viciifolia</i>	<i>T. colubriformis</i>	LMIA, LEA, EHA, LDA	150-1 200 µg/mL	oui (PEG)	Molan <i>et al.</i> , 2000
		<i>H. contortus</i>	LMIA, LEA	200-400 µg/mL	non	Molan <i>et al.</i> , 2002
		<i>T. circumcincta</i>	LMIA		oui (PEG)	Molan <i>et al.</i> , 2004
	<i>Hedysarium coronarium</i>	<i>T. colubriformis</i>	LMIA	200-400 µg/mL	oui (PEG)	Brunet <i>et al.</i> , 2007
			EHA, LDA		non	Molan <i>et al.</i> , 2000
	<i>Dorycnium rectum</i>	<i>T. colubriformis</i>	LMIA	200-400 µg/mL	oui (PEG)	Molan <i>et al.</i> , 2000
			EHA, LDA		non	Molan <i>et al.</i> , 2002
	<i>Lysiloma latisiliquum</i>	<i>H. contortus</i>	LMIA	150-1 200 µg/mL	oui (PVPP)	Alonso-Díaz <i>et al.</i> , 2008a,b
		<i>T. colubriformis</i>	LEA	1 200 µg/mL		
	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>H. contortus</i>	LMIA	150-1 200 µg/mL	oui (PVPP)	Alonso-Díaz <i>et al.</i> , 2008a,b
		<i>T. colubriformis</i>	LEA	1 200 µg/mL		
	<i>Havardia albicans</i>	<i>H. contortus</i>	LMIA	600-2 400 µg/mL	non	Hernandez-Orduño <i>et al.</i> , 2008
Autres plantes	<i>Acacia pennatula</i>	<i>H. contortus</i>	LMIA	150-1 200 µg/mL	oui (PVPP)	Alonso-Díaz <i>et al.</i> , 2008a,b
		<i>T. colubriformis</i>	LEA	1 200 µg/mL		
	<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	<i>H. contortus</i>	EHA	75-2 400 µg/ml	non	Hougangbe-Adote <i>et al.</i> 2005a,b
		<i>T. colubriformis</i>	LMIA	150-300-600 µg/ml		
	<i>Manihot esculenta</i>	<i>H. contortus</i>	LDA	300-2 400 µg/ml	non	Marie-Magdeleine <i>et al.</i> , 2010c
	<i>Musa × paradisiaca</i>	<i>H. contortus</i>	EHA	0,25-8 mg/mL	non	Altaf <i>et al.</i> , 2011
Tanins condensés purifiés						
	Extrait de quebracho (<i>Schinopsis sp.</i>)	<i>H. contortus</i>	LMIA	600-2 400 µg/mL	non	Hernandez-Orduño <i>et al.</i> , 2008
	<i>Onobrychis viciifolia</i>	<i>H. contortus</i>			oui (PEG ou PVPP)	Barrau <i>et al.</i> , 2005
		<i>T. colubriformis</i>	LMIA	1 200 µg/mL		Paulini <i>et al.</i> , 2004
Monomères de tanins condensés						
		<i>T. colubriformis</i>	EHA, LMIA	100-1 000 µg/mL		Molan <i>et al.</i> , 2003
		<i>H. contortus</i>	LDA, LEA	25-200 µg/mL		Brunet et Hoste, 2006

3.6.2. Études *in vivo*

Les résultats prometteurs précédemment atteints en laboratoire ont cependant été obtenus en dehors du contexte physiologique et immunologique rencontré chez l'hôte, c.à.d. qu'ils ne permettent en aucun cas de prédire les transformations et interactions potentielles des composés actifs dans le tractus digestif ; ils doivent par conséquent être corroborés par des études *in vivo* (Hoste *et al.*, 2008). Généralement celles-ci sont d'abord menées chez des animaux infestés en conditions contrôlées, puis la validité de leurs résultats est vérifiée en conditions naturelles. Les résultats de ces études réalisées lors d'infestations expérimentales ou naturelles sont présentés dans les tableaux 12 et 13 respectivement.

Pour confirmer les résultats *in vitro* indiquant un effet significatif des tanins condensés sur la biologie des L₃, quelques études ont montré expérimentalement que l'installation des L₃ était perturbée dans un environnement digestif riche en TC lié à la consommation d'une légumineuse tempérée (Niezen *et al.*, 1998b ; Tzamaloukas *et al.*, 2005) ou tropicale (Brunet *et al.*, 2008b) au moment de l'infestation. D'autre part, le rôle des tanins a même pu être confirmé par l'administration de PEG aux animaux, uniquement dans le cas du tzalam toutefois (Brunet *et al.*, 2008b).

Concernant les effets sur les populations de vers adultes déjà installées, les études sont beaucoup plus abondantes, surtout chez les légumineuses fourragères tempérées précédemment évoquées. En effet en régions tropicales, seuls le fagara et quelques espèces d'acacia ont été approfondis lors d'infestations naturelles. Dans la plupart des cas, que ce soit en conditions contrôlées ou naturelles, tempérées ou tropicales, la consommation de plantes riches tanins condensés a été associée à une réduction significative des niveaux d'OPG chez les ovins et les caprins, indiquant qu'elle peut contribuer par là à limiter la contamination des pâtures et par conséquent les dynamiques de réinfestation des animaux. En général, cette diminution de l'excrétion des œufs de parasites a été corrélée à une réduction soit de la charge parasitaire (nombre d'adultes retrouvés à l'autopsie), soit de la fertilité des vers femelles (ce dernier paramètre ayant été mesuré moins fréquemment toutefois).

Dans un nombre restreint d'études, aucun effet anthelminthique significatif n'a pu être mis en évidence. Cela a été le cas d'ovins consommant du lotier (Athanasiadou *et al.*, 2005 ; Niezen *et al.*, 1998b), du sulla (Athanasiadou *et al.*, 2005) ou de la dorycnie (Waghorn *et al.*, 2006), mais également de caprins consommant du sulla (Pomroy et Adlington, 2006) ou de l'acacia (Max, 2010). Cependant, ces résultats décevants trouvent souvent une explication soit dans une quantité insuffisante de TC présents dans la ressource ou consommés dans la ration à cause de problèmes d'inappétence, soit dans une durée d'expérimentation trop restreinte.

Malgré le profil biochimique complexe des PRT tropicales et la difficulté d'explorer *in vivo* le rôle des tanins dans les effets observés (Niezen *et al.*, 1998b), deux expériences ont pu rapporter toutefois l'utilisation effective du PEG : dans des études menées en conditions naturelles d'infestation chez des caprins pâturant extensivement dans la végétation arbustive locale (Kabasa *et al.*, 2000), ainsi que chez des ovins consommant des feuilles d'acacia (Akkari *et al.*, 2008), l'administration de PEG a provoqué une hausse significative des niveaux d'OPG, démontrant ainsi la participation des tanins dans les effets bénéfiques observés sur le parasitisme.

Par ailleurs, dans un certain nombre de ces études *in vivo*, la consommation de plante riche en TC a été associée en plus des effets antiparasitaires à une amélioration de la résilience de l'hôte par rapport aux témoins. Cette conséquence bénéfique a été évaluée au travers :

- ✓ des gains de poids vif essentiellement (Ho Bunyeth et Preston, 2006 ; Marley *et al.*, 2003 ; Niezen *et al.*, 1995, 1998a,b),

- ✓ du statut clinique des animaux (condition corporelle, scores de diarrhée, nombre de traitements ATH nécessaires, taux de mortalité) et de mesures pathophysiologiques (hématocrite) (Paolini *et al.*, 2005),

- ✓ des performances de production de lait (Hoste *et al.*, 2005) ou de laine (Niezen *et al.*, 1995).

Seuls Akkari *et al.* (2008) et Marie-Magdeleine *et al.* (2010a,b) ont noté des performances de croissance plus faibles chez les agneaux supplémentés avec des feuilles d'acacia, de bananier ou de manioc, incriminant la moindre valeur nutritive de ces ressources par rapport aux légumineuses fourragères et la diminution conséquente de la matière sèche digestible dans la ration.

Tableau 12. Effets *in vivo* de plantes riches en tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants : conditions expérimentales d'infestation (= : aucun effet ; + : réduction significative ; NS : réduction non significative ; aucun signe : non mesuré).

	Source de tanins condensés	Espèce hôte	Espèces de nématodes	Effet anthelminthique mesuré				Références
				installation des L ₃	excrétion fécale des œufs	charge parasitaire	fertilité des femelles	
Légumineuses	tempérées	<i>Lotus pedunculatus</i>	<i>T. circumcincta</i>	+	=	=	=	Tzamaloukas <i>et al.</i> , 2005
				+	+	=	=	Niezen <i>et al.</i> , 1998b
			<i>T. colubriformis</i>	=	=	=		Athanasiadou <i>et al.</i> , 2005
				=	+	=	=	Niezen <i>et al.</i> , 1998b
		<i>Lotus corniculatus</i>	<i>H. contortus</i>		+	+		Heckendorn <i>et al.</i> , 2007
		<i>Onobrychis viciifolia</i>	<i>H. contortus</i>		+	+	=	Heckendorn <i>et al.</i> , 2006
			<i>T. circumcincta</i>		+	NS		Thamsborg <i>et al.</i> , 2003
			<i>T. colubriformis</i>		+	=		
		<i>Hedysarium coronarium</i>	<i>T. circumcincta</i>		+	+		Niezen <i>et al.</i> , 20002
			<i>T. colubriformis</i>	=	=	=		Athanasiadou <i>et al.</i> , 2005
	tropicales	<i>Dorycnium rectum</i>	<i>T. colubriformis</i> <i>T. circumcincta</i>		=	=		Waghorn <i>et al.</i> , 2006
		<i>Lespedeza cuneata</i>	<i>H. contortus</i>		+	+		Shaik <i>et al.</i> , 2006
		<i>Lysiloma latisiliquum</i>	<i>H. contortus</i>		+	=	+	Martinez-Ortiz-de-Montellano <i>et al.</i> , 2010
			<i>H. contortus</i> <i>T. colubriformis</i>	+				Brunet <i>et al.</i> , 20008b
		<i>Havardia albicans</i>	<i>H. contortus</i>		NS			Méndez-Ortíz <i>et al.</i> , à paraître
					=	=	+	Hugo <i>et al.</i> , à paraître
		<i>Acacia karoo</i>	<i>H. contortus</i>		+	+		Kahiya <i>et al.</i> , 2003
Autres plantes		<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	<i>H. contortus</i>		NS	=	+	Houzangbe-Adote <i>et al.</i> 2005c
		<i>Manihot esculenta</i>	<i>H. contortus</i>		+	NS	=	Marie-Magdeleine <i>et al.</i> , 2010b
		<i>Musa × paradisiaca</i>	<i>H. contortus</i>		+	=	+	Rojas <i>et al.</i> , 2006 Marie-Magdeleine <i>et al.</i> , 2010a

Tableau 13. Effets *in vivo* de plantes riches en tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants : conditions naturelles d'infestation.
(= : aucun effet ; + : réduction significative ; NS : réduction non significative ; aucun signe : non mesuré)

	Source de tanins condensés	Espèce hôte	Effet anthelminthique mesuré			Références
			excrétion fécale des œufs	charge parasitaire	fertilité des femelles	
Légumineuses	tempérées	<i>Lotus pedunculatus</i>	=	=	=	Niezen <i>et al.</i> , 1998a
		<i>Lotus corniculatus</i>	=	=	=	
			+	+		Marley <i>et al.</i> , 2003
		<i>Onobrychis viciifolia</i>	+	=	+	Paolini <i>et al.</i> , 2005
		<i>Hedysarium coronarium</i>	+	+		Niezen <i>et al.</i> , 1995
			Caprins	=		Pomroy et Adlington, 2006
	tropicales	<i>Lespedeza cuneata</i>	+	+		Lange <i>et al.</i> , 2006
			Caprins	+		Terrill <i>et al.</i> , 2007
		<i>Acacia cyanophylla</i>	+			Akkari <i>et al.</i> , 2008
		<i>Acacia mollissima</i>	+	+		Minho <i>et al.</i> , 2008
Autres plantes			+	+		Cenci <i>et al.</i> , 2007
		<i>Acacia mearnsii</i>	NS	+		Max, 2010
			Caprins	=	=	
		<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	+			Houzangbe-Adote <i>et al.</i> 2005c
		<i>Manihot esculenta</i>	+			Ho Bunyeth et Preston, 2006
		<i>Musa × paradisiaca</i>	+			Altaf <i>et al.</i> , 2011

3.6.3. Variabilité des effets des tanins condensés

En bilan, si les résultats de ces nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont indubitablement démontré les effets positifs des tanins condensés sur le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux, leur hétérogénéité souligne peut-être plus encore le fait que ces effets anthelminthiques puissent être très variables et dépendent de plusieurs facteurs liés :

- ✓ à l'espèce hôte. Ainsi pour une même source de TC (le sulla par exemple), un effet anthelminthique peut être présent chez les ovins (Niezen *et al.*, 1995) mais pas chez les caprins (Pomroy et Adlington, 2006). Ces différences peuvent s'expliquer par les particularités comportementales et les adaptations physiologiques précédemment évoquées pour chaque espèce,

- ✓ à l'espèce parasitaire. En effet, des différences de sensibilité pour une même source de TC ont pu être observées, surtout entre espèces abomasales et intestinales (Molan *et al.*, 2004), voire entre deux espèces abomasales (Paolini *et al.*, 2004). Cette variabilité observée reflèterait *in vitro* des différences intrinsèques de sensibilité des nématodes aux TC, tandis que *in vivo* les différences de pH selon l'organe digestif concerné expliqueraient les différences de disponibilité des TC sous forme libre et, en conséquence, d'exposition des vers à ces composés,

- ✓ au stade parasitaire. Des variations non négligeables d'efficacité ont également été décrites entre les L₃ et les populations de vers adultes (Tzamaloukas *et al.*, 2005), pouvant s'expliquer par des particularités biologiques propres et des modes d'action divergents des TC sur les deux stades,

- ✓ aux sources de TC exploitées, nature (composition biochimique et structure) et concentrations en TC apparaissant comme deux facteurs importants à considérer (Hoste *et al.*, 2006) et pouvant par exemple expliquer les différences observées entre les deux légumineuses fourragères similaires que sont les lotiers pédonculé et corniculé.

3.6.4. Modes d'action des tanins condensés

Deux hypothèses ont été proposées (Min *et al.*, 2003 ; Hoste *et al.*, 2006) :

- ✓ un mode d'action indirect par l'amélioration de la réponse immunitaire de l'hôte (le rôle protecteur des tanins condensés vis-à-vis des dégradations ruminales des protéines entraînant un flux et une absorption accrus d'acides aminés dans l'intestin grêle). Cependant peu d'études et de résultats ont exploré cette hypothèse qui demande encore à être étayée,

- ✓ un mode d'action direct sur les nématodes, s'expliquant par l'aptitude des tanins condensés à se lier notamment aux protéines parasitaires et à affecter en conséquence la biologie des vers. Cette seconde hypothèse est soutenue par l'ensemble des résultats *in vitro* ainsi que par les études *in vivo* de courte durée ou se déroulant chez de jeunes animaux naïfs constituant des circonstances peu propices à l'expression de l'immunité de l'hôte. Les tanins condensés seraient ainsi capables de se fixer aux protéines et glycoprotéines de la cuticule des adultes et de la gaine des L₃ (deux structures riches en proline et hydroxyproline), aux enzymes sécrétées par les vers et impliquées dans diverses fonctions essentielles, ou encore d'interagir avec leur épithélium digestif.

4. Le marc de café comme source atypique de tanins condensés

4.1. Importance du marc de café dans le monde et au Mexique

8,3 millions de tonnes de café ont été produits en 2010. Le marc de café (en espagnol *poso de café* et en anglais *spent coffee grounds*, SPG), issu d'une des boissons les plus populairement consommées dans le monde, est un déchet produit aussi bien à l'échelle domestique qu'industrielle : sa gestion représente ainsi un défi majeur notamment pour les entreprises, près de la moitié de la production mondiale servant en effet à la fabrication de café soluble instantané (préparation de café ensuite lyophilisée ou atomisée pour se retrouver sous forme de poudre).

La problématique environnementale engendrée par ce sous-produit du café n'épargne pas le Mexique : avec 4,5 millions de sacs de 60 kg (plus de 95% du café produit étant *C. arabica*), il est le 6^e producteur de café au monde, cependant loin derrière le Brésil (55 millions) et le Vietnam (19 millions). Avec 2,9 millions de sacs, il n'est en revanche que 11^e sur le plan des exportations (près d'1/4 sous forme de café soluble), ce qui signifie que 30-40% de la production sert pour la consommation nationale (FAS/USDA, décembre 2010). On a ainsi pu calculer que le Mexique a produit en 2010 environ 150 000 tonnes de marc de café, dont les 3/4 à l'échelle domestique.

4.2. Composition phénolique du marc de café

Malgré l'intérêt accordé aux sous-produits du café (Esquivel et Jimenez, 2011), paradoxalement aucun article n'a été publié à ce jour sur le sujet. Il y a vingt ans Clifford et Ramirez-Martinez (1991), en analysant en HPLC les pigments produits par auto-oxydation des TC solubles en présence du réactif de Porter (test du butanol-HCl), ont détecté moins de 1% de TC dans la pulpe de *C. arabica* et ont conclu à l'absence de TC dans les grains de café vert. Depuis les études se sont largement focalisées sur le café boisson, plus aucune ne s'attachant à les mettre en évidence dans le grain et encore moins dans le marc de café. Pourtant, du fait de leurs structures complexes et variées, l'analyse des tanins condensés est délicate et leur dosage souvent difficile (Hagerman, 1987). Clifford et Ramirez-Martinez (1991) ont ainsi eux-mêmes reporté que les méthodes alors disponibles ne permettaient pas de mesurer les TC insolubles (c.à.d. ceux hautement polymérisés ou liés avec les fibres et protéines végétales), ces derniers pouvant donc être présents en quantités beaucoup plus conséquentes.

Plus récemment Ramirez-Colonel *et al.* (2004) ont utilisé une méthode chromatographique complexe (HPLC couplée à la thiolyse qui permet le clivage des liaisons inter-flavaniques et ainsi la dépolymérisation des TC) associée à la spectrophotométrie de masse, permettant de caractériser et de quantifier beaucoup plus finement les polyphénols de la pulpe de café. Cette dernière contiendrait ainsi majoritairement des tanins condensés relativement peu polymérisés (15-20% MS, degré de polymérisation moyen 4-6) et des acides hydroxycinnamiques (15-16% MS). La différence majeure constatée avec les résultats précédents laisse imaginer que le grain de café pourrait lui aussi finalement contenir des tanins condensés en quantités non négligeables. Les travaux de Nieves-Guerrero *et al.* (2009) viennent d'ailleurs renforcer cette hypothèse en montrant une teneur de 4,5% de TC dans un extrait acétonique de marc de café humide.

D'autre part, les composés phénoliques majoritairement mesurés et identifiés dans les grains de café vert sont les acides chlorogéniques (ACG, jusqu'à 8% de la MS chez *C. arabica*) (Farah et Donangelo, 2006) : formés par l'estérification d'un acide quinique avec 1 à 3 molécules d'acides hydroxycinnamiques, ceux retrouvés

principalement dans le café sont les acides caffeoylquiniques, féruloylquiniques et dicaffeoylquiniques. Jouant un rôle important dans les arômes du café, ils sont également capables de former des complexes avec les protéines. Ils possèdent en outre un pouvoir antioxydant élevé et ont montré des activités hypoglycémique, antivirale, hépatoprotectrice et antispasmodique (Ramalakshmi *et al.*, 2009). Au cours de la torréfaction, ils sont en partie isomérisés, hydrolysés, dégradés, transformés en lactones et mélanoidines, conduisant ainsi à des pertes drastiques avec un contenu final de 0,5 à 7% dans le grain torréfié, ce qui est toutefois encore relativement important par rapport aux autres sources alimentaires. Enfin les ACG sont ultérieurement extraits de manière conséquente (80-100%) lors de la préparation de la boisson. D'autres polyphénols ont été également identifiés en quantités plus mineures : anthocyanidols et lignanes.

Dans notre contexte tanins condensés et effets anthelminthiques associés, les conclusions à retenir de ces résultats antérieurs sont les suivantes :

- ✓ malgré l'absence d'étude spécifique sur la composition phénolique du marc de café, ce dernier doit partager globalement les mêmes composés avec la boisson et le grain torréfié, seules les proportions différant,

- ✓ l'hypothèse de la présence de tanins condensés (insolubles) dans le marc de café ne peut être exclue.

4.3. Études *in vitro* et *in vivo* sur la valorisation potentielle du marc de café dans l'alimentation des ruminants

McNiven *et al.* (1977), Morgan et Trinder (1980) ont commencé par étudier la composition et la valeur nutritionnelle du marc de café et ont trouvé des digestibilités basses de la matière sèche et de la pepsine. Sikka *et al.* (1985) ont par la suite poursuivi l'évaluation *in vitro* et obtenu une solubilité de l'azote faible, invoquant la dénaturation des protéines ou la formation de liaisons intramoléculaires lors de la torréfaction. L'apparente faible valeur alimentaire les a alors fait conclure à un potentiel limité d'incorporation du marc de café dans l'alimentation des ruminants.

Bartley *et al.* (1978) observèrent d'une part une diminution de la consommation et du gain de poids vif lors de l'addition croissante de 5 ou 10% de marc de café dans la ration céréalières de vaches laitières et de bœufs en finition. Ils mesurèrent également une diminution de la production de gaz, de la clairance de la matière sèche et du rapport acides gras volatiles/acide lactique, signalant ainsi un effet préjudiciable sur la fermentation ruminale. Givens et Barber (1986), en incluant le marc de café dans la ration d'ovins (30 et 40% de la MS), obtinrent une énergie métabolisable négative, des coefficients de digestibilité ainsi qu'une énergie brute digestible faibles, indiquant en conclusion que le matériel était sans intérêt. Plus récemment, Xu *et al.* (2007) ont travaillé *in vivo* sur l'alimentation de moutons avec des ensilages contenant différentes concentrations de marc de café (0, 10 et 15% MS) : ils ont observé une chute globale de l'ingestion de matière sèche, du taux de fixation de l'azote et de la digestibilité des nutriments dans le second groupe. De plus la diminution dans le fluide ruminal des AGV totaux et du ratio acétate/propionate a suggéré une inhibition des fermentations microbiennes dans le rumen. Ils ont finalement conclu à une faible disponibilité des nutriments du marc de café et recommandent en conséquence de ne pas l'incorporer à plus de 10% de la MS dans la ration des ruminants et de l'utiliser dans des rations d'entretien ou ayant de faibles objectifs de production.

Ainsi divers auteurs ont exploré le potentiel nutritionnel du marc de café, les résultats décevants démontrant au contraire un effet antinutritionnel au-delà de certaines concentrations.

4.4. Étude *in vitro* sur les propriétés anthelminthiques du marc de café

Nieves-Guerrero *et al.* (2009) ont récemment trouvé qu'un extrait acétonique de marc de café humide contenant 4,5% de tanins condensés inhibait significativement 24% de la migration larvaire de *H. contortus* à la concentration 2 400 µg.L⁻¹. En effectuant une nouvelles série de mesures avec du PVPP, ils ont de plus confirmé le rôle des tanins dans l'activité anthelminthique.

Cependant, à ce jour et à notre connaissance, personne n'a encore étudié la variabilité des composés bioactifs responsables de l'effet antiparasitaire observé, ni aucune étude de terrain (que ce soit en conditions d'infestation naturelle ou expérimentale) n'est venue corroborer l'efficacité anthelminthique démontrée *in vitro*. La caractérisation biochimique du matériel exploité, ainsi que l'évaluation *in vivo* de son innocuité (absence de toxicité) et de son efficacité sont pourtant des étapes clefs dans l'identification et la validation scientifique de plantes bioactives pouvant être incluses dans le contrôle des nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants (Hoste *et al.*, 2008).

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE *IN VITRO*

L'utilisation des plantes riches en tanins condensés est envisagée comme une des alternatives possibles aux anthelminthiques de synthèse pour un contrôle intégré et durable du parasitisme gastro-intestinal chez les petits ruminants. Cependant, compte tenu de la fréquence et de la vitesse d'apparition des phénomènes de résistance dans les populations de nématodes, l'hypothèse que les vers développent à leur tour des résistances aux TC est à considérer sérieusement et représente une limite à l'emploi des ces molécules naturelles. C'est pourquoi aujourd'hui la recherche se tourne également vers d'autres sources potentielles de tanins, notamment certains sous-produits agroindustriels. Les TC sont des métabolites secondaires appartenant à la grande famille des flavonoïdes et qui ont la propriété de se fixer aux protéines. Bien que leurs mécanismes d'action restent incomplètement compris, il a été suggéré que les TC affecteraient entre autres la capacité d'éclosion des œufs de strongles. Dans cette étude, nous avons testé cette hypothèse en utilisant le marc de *Coffea arabica*, un déchet majeur engendré par la caféiculture mexicaine, comme modèle de sous-produit riche en tanins. Des travaux précédents menés *in vitro* ont en effet montré qu'un extrait tannique de marc de café affectait la mobilité des larves infestantes de *Haemonchus contortus*. Cependant, dans les nombreuses études ayant démontré l'effet anthelminthique de plantes riches en tanins, en général une forte variabilité a été observée dans les résultats, notamment en fonction de la ressource végétale exploitée et du stade parasitaire considéré.

1. Objectif général

L'objectif général de cette première phase expérimentale a été d'étudier *in vitro* la variabilité dans le contenu, l'activité biologique et l'effet anthelminthique d'extraits tanniques de marc de différents cafés (*Coffea arabica*) produits et commercialisés au Mexique. Les travaux ont été conduits en prenant comme modèle la même souche de *Haemonchus contortus*, un nématode majeur parasite de l'abomasum des petits ruminants.

2. Objectifs spécifiques

De façon plus détaillée, cette étude a eu pour objectifs de :

- i) réaliser une collection d'extraits tanniques de café (marc de café résiduel obtenu après percolation des grains moulus) provenant de différentes marques,
- ii) déterminer la variabilité dans le contenu en polyphénols totaux, tanins condensés et activité biologique des divers extraits,
- iii) évaluer la variabilité d'efficacité anthelminthique mesurée *in vitro* entre les différents extraits sur l'éclosion des œufs de *Haemonchus contortus*.

3. Matériel et méthodes

3.1. Matériel biologique

Huit produits différents contenant au moins 250 g de café torréfié et moulu, 100% Arabica et provenant de diverses régions du Mexique, furent achetés dans le commerce :

- café TAZZA GOLD[®] Veracruz Ancestral,
- café TAZZA GOLD[®] Oaxaca Místico,
- café TAZZA GOLD[®] Chiapas Exubérante,
- café STARBUCKS[™] Mexico Clean and Smooth,
- café STARBUCKS[™] Shade Grown México,
- café GARAT[®] Regular,
- café GARAT[®] Descafeinado,
- café INTERNATIONAL[®] Descafeinado.

Par souci de clarté, ils sont désignés par les appellations respectives suivantes : Tazza Vera Cruz, Tazza Oaxaca, Tazza Chiapas, Starbucks CS, Starbucks SG, Garat, Garat Décaf et Inter Décaf.

3.2. Obtention du marc de café sec

Pour chacun des produits, 250g de café furent utilisés pour 4 L d'eau purifiée selon le principe de percolation et au moyen d'une cafetière électrique Regal[®] K7030. Le marc résiduel du café ainsi récemment préparé fut ensuite récupéré et mis à sécher à 50 °C durant environ 72 h (à l'air libre aux heures les plus chaudes ainsi qu'à l'aide d'une étuve SHEL LAB[®] 1370GX), ceci jusqu'à stabilisation du poids indiqué par la balance (Sartorius[®] BLG10, 610 g x 0,01).

3.3. Obtention des extraits tanniques de marc de café

L'extraction fut réalisée au laboratoire de nutrition du Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán (FMVZ-UADY), Mérida, Yucatán, México, d'après la méthode suivante décrite par Hagerman (1987).

Chacun des matériaux précédemment obtenus (entre 181 et 241 g de marc de café sec) fut ajouté à une solution d'acétone-eau 70:30 (v/v, 3 L de solution pour 250 g de matériel végétal) contenant 1 g.L⁻¹ d'acide ascorbique pour limiter l'oxydation. Le mélange fut soumis à un bain d'ultrasons (Branson[®] 5510) pendant 20 min (ceci afin de forcer la pénétration du solvant dans les matériaux), puis filtré à travers du papier filtre Whatman n° 40. L'acétone contenue dans l'extrait fut distillée sous pression réduite à 40 °C et 35 rpm dans un évaporateur rotatif (IKA[®] RV 10). Les graisses et pigments furent éliminés au moyen de deux lavages de la solution aqueuse résiduelle avec du dichlorométhane (rapport 1:1) et avec l'aide du bain d'ultrasons (5 min), la fraction de solvant étant chaque fois séparée grâce à une ampoule à décanter. L'extrait aqueux obtenu fut enfin congelé et lyophilisé (LABCONCO[®] Free Zone 2.5). Le rendement de l'extraction fut calculé à l'issue de cette ultime étape, puis la poudre restante fut maintenue réfrigérée à 4 °C dans des flacons en verre scellés jusqu'à son utilisation dans les essais biochimiques et biologiques ultérieurs.

3.4. Quantification des composés polyphénoliques et de l'activité biologique

3.4.1. Méthode de Folin-Ciocalteu

Cette méthode (Makkar, 2003) fut utilisée pour quantifier le contenu des extraits en phénols totaux (PT). Elle est basée sur la réduction par les groupes phénoliques libres de l'acide phosphomolybdique du réactif employé, produisant ainsi un complexe appelé bleu de molybdène. Un échantillon de chaque extrait lyophilisé fut remis en suspension dans une solution aqueuse d'acétone à 70%. La courbe de calibration fut obtenue avec une solution standard d'acide tannique et les absorbances furent lues à 725 nm (spectrophotomètre Perkin Elmer® Lambda 25). Les résultats furent exprimés comme équivalents d'acide tannique.

3.4.2. Test de la vanilline-HCl

La quantité de tanins condensés (TC) présents dans les extraits fut déterminée selon la méthode décrite par Price *et al.* (1978). Le principe est que la vanilline réagit en milieu acide avec le cycle aromatique A des flavanols pour former un chromophore magenta détectable par spectrophotométrie. Il est à noter que le test n'est pas totalement spécifique puisqu'il détecte également les flavonoïdes simples. Un échantillon de chaque extrait lyophilisé fut remis en suspension dans une solution aqueuse d'acétone à 70%. La courbe de calibration fut préparée à partir d'une solution standard de catéchine et les absorbances furent lues à 520 nm. Les résultats furent exprimés comme équivalents de catéchine.

3.4.3. Test de diffusion radiale

L'activité biologique (AB) de fixation aux protéines fut mesurée grâce à la technique développée par Hagerman (1987) et modifiée par Reyes (1993). Les molécules de tanins migrent à travers un gel d'agarose imprégné de protéine avec laquelle ils forment des complexes insolubles, permettant ainsi de déterminer leur capacité de précipitation protéique. L'agar fut préparé avec un tampon d'acétate dont le pH fut ajusté à 5,0 avec NaOH et contenant 10 g.L⁻¹ d'agarose (Baker® A247-05) et 100 mg.L⁻¹ d'hémoglobine bovine (SIGMA-ALDRICH® H-2625). Dans chaque plaque de Pétri (8.5 cm de diamètre) furent placés 10 mL de la solution ainsi obtenue puis cinq puits de 4 mm de diamètre furent réalisés dans l'agar une fois solidifié. 15 µL d'une solution standard de résorcinol (SIGMA-ALDRICH® R-5645, 5 g de résorcinol dans 5 mL de méthanol à 70%) fut pipeté dans le puits central, tandis que 15 µL d'une solution de chaque extrait (0.1 g d'extrait lyophilisé dans 10 mL d'acétone à 70%) fut pipeté dans les puits externes. Les plaques furent scellées et incubées à 25 °C pendant 48 h, au terme desquelles le diamètre du halo de diffusion radiale/précipitation fut mesuré avec un vernier digital (Auto TEC™, résolution 0,01 mm et précision 0,03 mm). L'activité de précipitation protéique ou AB est proportionnelle au carré du diamètre et fut exprimée relativement au standard.

3.5. Mesure de l'activité anthelminthique *in vitro*

3.5.1. Infestation expérimentale

Quatre caprins femelles Criollo âgés de 4 mois et pesant en moyenne $15,2 \pm 2,8$ kg furent infectés de façon monospécifique avec une dose orale unique contenant 3000 L₃ de *H. contortus* (souche ovine CENID-PAVET-INIFAP, Mexique).

3.5.2. Collecte des œufs de *Haemonchus contortus*

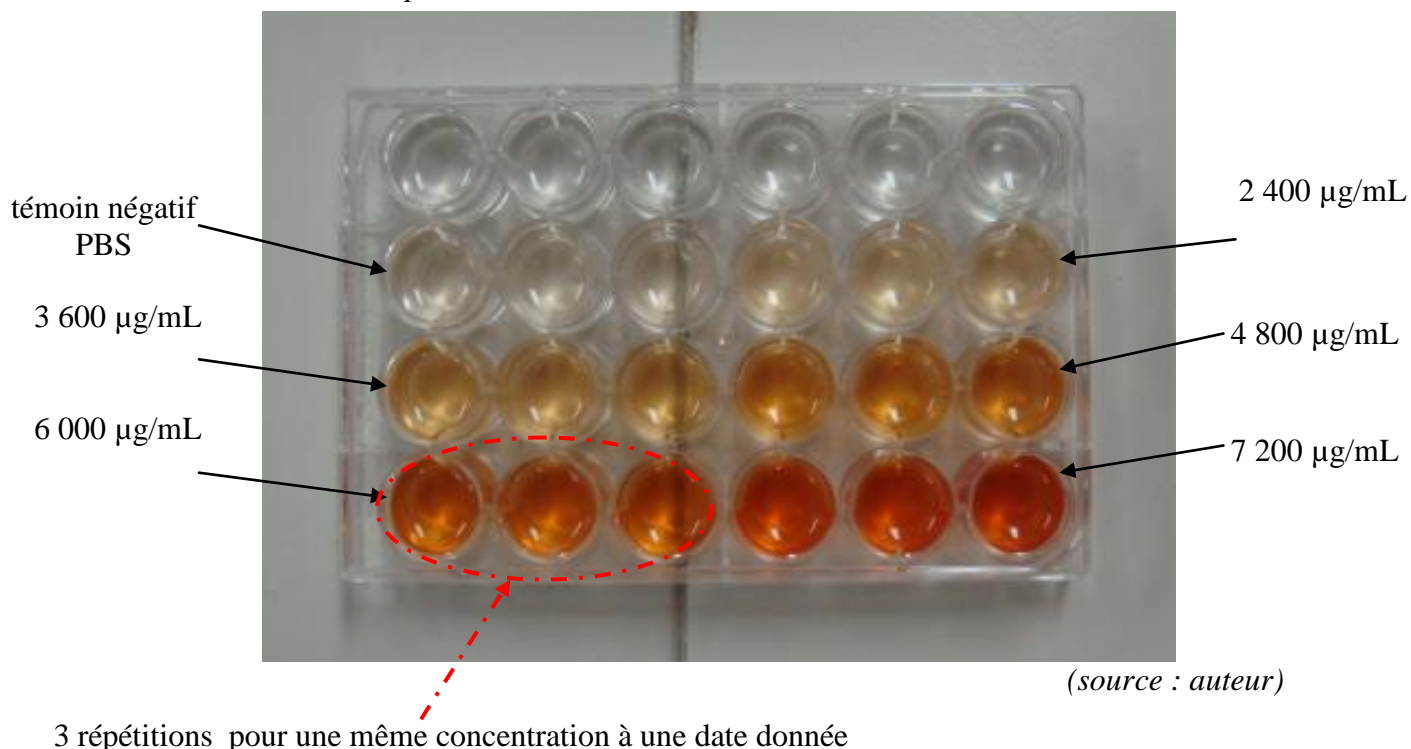
Les œufs employés ultérieurement dans l'essai *in vitro* furent obtenus selon la technique décrite par Coles *et al.* (1992). Entre 35 et 40 jours post-infection, les fèces des animaux donneurs furent récoltées par voie rectale dans des sachets plastique jusqu'à trois fois par jour, immédiatement réfrigérées à 4 °C pour prévenir tout développement larvaire, puis traitées au laboratoire de parasitologie du campus dans les trois heures suivant la collecte afin d'éviter toute modification de la perméabilité membranaire des œufs. Les matières fécales furent macérées dans de l'eau purifiée, la suspension filtrée à l'aide d'une bande de gaze et le filtrat ensuite réparti dans des tubes Eppendorf de 14 mL. Les tubes furent mis à centrifuger à 1 500 rpm pendant 5 min (BHG[®] ROTO-UNI). Une fois le surnageant éliminé, ils furent complétés avec une solution sucrée saturée (densité $\geq 1,27$, vérifié avec un densimètre à poids constant ERTCO[®], agités au vortex jusqu'à bien dissoudre le sédiment et centrifugés une dernière fois. Les œufs se retrouvant ainsi dans la couche superficielle de la solution, ils purent enfin être récupérés à l'aide d'une tige métallique terminée par une anse et concentrés dans un tube à essai contenant 6 mL d'eau purifiée. Les différentes suspensions ainsi obtenues furent conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation et leur concentration fut calculée en comptant à x20 (microscope Olympus[®] CH30) le nombre d'œufs présents dans 8 gouttes de 20 µL prélevées à l'aide d'une micropipette (Finnpipette[®] Digital).

3.5.3. Test d'éclosion des œufs

Le test fut conduit en suivant la procédure recommandée par la WAAVP (Coles *et al.*, 1992). L'activité anthelminthique *in vitro* de chacun des huit extraits de café contre *H. contortus* fut évaluée en utilisant les concentrations 2 400, 3 600, 4 800, 6 000 et 7 200 µg d'extrait/mL, ainsi qu'un témoin négatif (PBS ; pH 7,4 ; SIGMA-ALDRICH[®] P-3813). Pour chaque concentration et pour le témoin, six répétitions furent réalisées à deux dates distinctes dans le temps, nécessitant ainsi l'emploi de deux plaques multipuits (COSTAR[®] 3526) par extrait étudié (figure 7).

Dans chacun des 18 puits occupés par plaque furent déposés 1 mL de suspension à 200 œufs/mL (obtenue par dilution de la solution mère préparée à l'étape précédente) et 1 mL contenant des volumes adéquats de PBS et d'extrait de marc de café dilué afin d'atteindre la concentration souhaitée. Les plaques ainsi préparées furent mises à incuber à 27 °C pendant 48 h (étuve bactériologique BGH[®] E71) au terme desquelles 2 gouttes de solution iodée de Lugol furent versées dans chaque puits afin de tuer et colorer les œufs et larves écloses. Les plaques furent conservées par la suite au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à leur lecture finale, où le contenu de chaque puits fut transvasé à l'aide d'une seringue de 1 mL dans deux lames de McMaster lues à x20.

Figure 7. Plaque multipuits employée dans le test d'éclosion des œufs. Chaque intensité de coloration correspond à une concentration d'extrait de marc de café.



Le pourcentage d'éclosion fut calculé comme $L/T \times 100$, où L est le nombre de larves écloses et T le nombre total d'œufs et larves comptés. Seules les plaques où le pourcentage d'éclosion des puits contrôles était supérieur à 70% furent prises en compte dans les calculs (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2009). Pour chaque répétition, le taux d'éclosion fut corrigé par le taux d'éclosion moyen du contrôle de la plaque correspondante, puis le pourcentage d'inhibition de l'éclosion fut calculé selon les formules suivantes (von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2002) :

$$LH-I (\%) = 100 - LH$$

$$LH (\%) = LH_{DIL}/LH_C \times 100$$

Où : $LH-I$ = l'inhibition de l'éclosion larvaire,
 LH = l'éclosion larvaire,
 LH_{DIL} = l'éclosion larvaire de la dilution,
 LH_C = l'éclosion larvaire moyenne du contrôle correspondant.

Enfin le pourcentage moyen d'inhibition de l'éclosion et l'écart-type furent déterminés pour chacune des concentrations des différents extraits ainsi que pour les contrôles correspondants.

3.6. Analyses statistiques (test d'éclosion des œufs)

Les valeurs significativement incohérentes furent tout d'abord détectées grâce au test de Grubb (Graphpad® Quickcalcs, Graphpad Software, Inc. 2002 - 2005) afin de les écarter des calculs. D'autre part les valeurs ne présentant pas une distribution normale, une analyse de variance non paramétrique de Kruskal-Wallis fut utilisée pour déterminer une différence entre les pourcentages moyens d'inhibition de l'éclosion (Statgraphics® Centurion XV, Statpoint, Inc. 1982 – 2007).

4. Résultats

4.1. Collection d'extraits tanniques de marc de café

Les extractions successives ont ainsi permis de constituer une réserve d'extraits tanniques provenant de différents marcs de café (figure 8). Conservés au frais à 4 °C, ils serviront notamment dans le futur à étudier *in vitro* les variations d'efficacité anthelminthique selon l'espèce et le stade parasite considérés.

Figure 8. Collection d'extraits tanniques de huit marcs de café différents.



(source : auteur)

4.2. Composés phénoliques et activité biologique des extraits de marc de café

On note tout d'abord une variabilité importante tant dans le rendement de l'extraction que dans les pourcentages de phénols totaux et tanins condensés ainsi que dans l'activité biologique des différents extraits de café, avec des fourchettes de valeurs allant respectivement de 3,18 à 5,83%, 12,28 à 19,28%, 1,00 à 6,33% et 4,41 à 7,73 (tableau 14).

Seul l'extrait Tazza Chiapas a des valeurs élevées de PT, TC et AB. Ces dernières sont toutes faibles en revanche dans le cas de l'extrait Starbucks CS. Les extraits Tazza Oaxaca, Tazza Vera Cruz et Garat Décafé présentent les pourcentages de PT et TC les plus hauts et l'AB la moins bonne. Ceux avec la meilleure AB sont les Starbucks SG, Garat et Inter Décafé, bien que leurs valeurs de PT et TC soient relativement basses.

Tableau 14. Variabilité du rendement, des composés polyphénoliques et de l'activité biologique des huit extraits de marc de café (%).

Extrait de marc de café	Rendement	PT	TC	AB
Tazza Vera Cruz	3,85	18,19	5,58	4,41
Tazza Oaxaca	3,33	19,28	6,33	4,86
Tazza Chiapas	3,18	17,79	5,89	7,73
Garat	4,85	17,84	2,02	6,10
Garat Décafé	3,85	17,97	6,20	5,78
Inter Décafé	5,83	15,22	1,00	5,90
Starbucks SG	5,81	12,28	2,66	6,57
Starbucks CS	5,02	13,95	2,28	4,91

PT = phénols totaux, exprimés en g équivalents d'acide tannique/100g MS.

TC = tanins condensés, exprimés en g équivalents de catéchine/100g MS.

AB = activité biologique, mesurée en unités de précipitation relative au résorcinol par g d'extrait.

4.3. Test d'éclosion des œufs

Les pourcentages d'éclosion dans les puits contrôles furent systématiquement supérieurs à 70% et s'étalent de 71,4 à 97,7%, rendant l'analyse possible pour toutes les plaques préparées. En revanche, le manque de solubilité des extraits dans les concentrations supérieures à 2 400 µg.mL⁻¹ ne permit de travailler correctement qu'avec cette dernière, le bon comptage des œufs et larves écloses étant rendu beaucoup plus incertain dans les autres cas et compromettant ainsi de manière importante la fiabilité des résultats espérés. Par conséquent et bien que normalement attendues à l'issue de ce test, les concentrations efficaces requises pour inhiber 50% de l'éclosion (EC₅₀) ne purent être déterminées. Seuls les résultats concernant la concentration 2 400 µg.mL⁻¹ sont donc disponibles et présentés dans le tableau 15.

Relativement aux contrôles, tous les extraits testés montrent un effet anthelminthique marqué à la concentration étudiée. Une valeur significativement aberrante ne fut pas prise en compte dans le cas des extraits Garat et Starbucks SG (annexe 1). L'inhibition de l'éclosion fut très variable selon les puits pour l'extrait Tazza Oaxaca (de 22,0 à 75,4%) et une plaque entière semble ne pas avoir fonctionné dans le cas de l'extrait Starbucks CS (11,2, 20,2 et 24,0%), ce qui explique pourquoi ces deux derniers se démarquent des six autres dont les résultats sont similaires (pourcentages moyens d'inhibition allant de 87,3 à 94,9).

Tableau 15. Variabilité de l'effet *in vitro* des huit extraits de marc de café sur l'éclosion des œufs de *Haemonchus contortus* (% moyen d'inhibition ± écart-type). Tous les extraits testés montrent une activité anthelminthique notable.

Extrait de marc de café	Dose	
	PBS (contrôle)	2400 µg d'extrait/mL PBS
Tazza Vera Cruz	7,3 ± 2,8	91,6 ± 3,7 ^a
Tazza Oaxaca	6,6 ± 2,0	53,7 ± 22,8 ^b
Tazza Chiapas	6,5 ± 2,8	91,6 ± 5,6 ^a
Garat	6,4 ± 1,5	92,8 ± 1,8 ^a
Garat Décaf	5,8 ± 2,2	94,9 ± 3,3 ^a
Inter Décaf	15,6 ± 8,1	87,3 ± 6,1 ^a
Starbucks SG	5,5 ± 2,4	92,4 ± 8,9 ^a
Starbucks CS	7,5 ± 2,6	57,7 ± 43,2 ^b

Des lettres distinctes au sein d'une même colonne indiquent une différence statistique significative entre les extraits (P<0,05).

5. Discussion

Lorsqu'on étudie des plantes riches en tanins, on essaie de contrôler au maximum les conditions de collecte, de séchage et de stockage de ces ressources afin de minimiser les variations dans la teneur et la nature de leurs composés phénoliques ; ceci n'est pas possible avec le marc de café car on travaille à partir d'un produit déjà fini dont les conditions précises de fabrication sortent largement de notre domaine d'influence. D'autre part, le problème inhérent au procédé général d'extraction (ceci quelle que soit la ressource végétale employée) est que le solvant extrait forcément de nombreux autres métabolites secondaires en plus des tanins condensés, laissant ainsi planer une incertitude limitative quant à la nature exacte des composés bioactifs responsables des effets observés. Des difficultés ont également été rencontrées dans la récupération d'un nombre suffisant d'œufs de *H. contortus* pour les tests d'éclosion, car le nombre d'animaux prélevables était faible et par ailleurs leur infestation était déjà relativement ancienne, de sorte que les niveaux d'excrétion parasitaire allaient chaque jour en décroissant.

5.1. Composés phénoliques et activité biologique des extraits de marc de café

Tout d'abord il est à noter que les résultats des analyses biochimiques effectuées sur l'extrait Garat (PT 17,84%, TC 2,02%, AB 6,10) ne sont pas tout à fait cohérents avec ceux précédemment obtenus par Nieves-Guerrero *et al.* (2009) avec le même produit (PT 17,11%, TC 4,53% et AB 1,30). Avec une teneur sensiblement égale en phénols totaux mais plus forte en tanins condensés, on pourrait en effet logiquement s'attendre à une meilleure activité biologique chez ce dernier ; cependant c'est loin d'être le cas et il faut probablement mettre en relation ce phénomène avec l'existence de différences singulières dans les procédures d'extraction suivies : Nieves-Guerrero *et al.* (2009) ont en effet travaillé avec du marc humide provenant de café récemment préparé (37,5% MS), ce qui a probablement conduit, en diluant ainsi la concentration de solvant en contact avec les composés phénoliques, à un rendement d'extraction moins bon. Dans notre cas, le matériel obtenu fut mis à sécher un temps conséquent, s'exposant ainsi à de possibles changements enzymatiques dans les composés phénoliques (Makkar, 2003). L'intérêt d'évoquer ce point réside avant tout dans le fait qu'il permet de rappeler et souligner l'importance de répéter de manière scrupuleusement identique un même protocole si l'on souhaite pouvoir ensuite comparer les résultats entre eux. Enfin, sans que nous ayons toutefois accès aux informations permettant de vérifier la pertinence de cette hypothèse, des différences intrinsèques au produit Garat (variétés cultivées, année de récolte, numéro de lot, etc) pourraient également expliquer ces divergences de résultats.

Ainsi donc, on voit que les résultats de PT, TC et AB varient notamment avec le procédé d'extraction : généralement le méthanol 50% et l'acétone 70% sont les solvants aqueux les plus populairement utilisés pour l'extraction des phénols contenus dans le feuillage des arbres, la dernière étant d'autre part fréquemment rapportée comme étant plus appropriée (Makkar, 2003). Bravo *et al.* (2011), à l'issue de leur travail de sélection et d'optimisation de la méthode la plus efficace pour extraire les antioxydants du marc de café, ont récemment formulé les conclusions suivantes : la comparaison de l'influence du système d'extraction, de plusieurs solvants (eau, éthanol, méthanol en proportions variables), d'extractions successives et de différents pH de l'eau sur le pouvoir antioxydant (mesuré par la quantité de PT et l'activité de piégeage des radicaux libres), les a conduits à porter leur choix sur une procédure d'extraction en une seule fois employant de l'eau neutre et une cafetière filtre, suivie d'une étape de dégraissage et de lyophilisation. Cependant, dans le contexte d'une extraction de TC insolubles dans l'eau et dans l'hypothèse d'une production d'extrait à plus grande échelle en vue de son administration aux animaux, il pourrait être judicieux à l'avenir de vérifier les résultats

de Clifford et Ramirez-Martinez (1991), qui signalent quant à eux un meilleur rendement d'extraction des TC de la pulpe de café (mesuré ici avec le réactif de Porter dans le test du butanol-HCl-Fe³⁺) avec l'acétone 50% contenant 0,5% d'acide formique.

D'autre part, le protocole d'extraction ayant été suivi de manière rigoureusement identique à chaque fois, le contenu et la nature des composés phénoliques peuvent également varier selon l'espèce et le cultivar, le degré de maturation des grains de café, les conditions de culture (pratiques caféiculturales utilisées, type de climat et sol), un éventuel processus de décaféination (perte moyenne de 10% des acides chlorogéniques observée), le procédé de torréfaction employé, le mode de préparation de la boisson et enfin selon la méthode d'extraction et d'analyse (Farah et Donangelo, 2006).

Comme pour Nieves-Guerrero *et al.* (2009), le test de la vanilline a mis en évidence des tanins condensés en concentrations significatives et s'oppose ainsi une seconde fois aux résultats négatifs de Clifford et Ramirez-Martinez (1991), avec la remarque toutefois que ces TC peuvent en fait aussi bien être des monomères que des oligo- ou polymères des flavan-3-ols, étant donné la spécificité du test employé. On peut de plus considérer que ces mêmes résultats sont plus que satisfaisants et prometteurs si on les compare avec les études *in vitro* précédemment réalisées sur différents extraits de plantes fourragères tropicales riches en tanins et communément rencontrées dans la végétation native du Yucatán (Alonso-Díaz *et al.*, 2008a, 2010a ; Hernandez-Orduño *et al.*, 2008) : elles ont en effet révélé des teneurs en composés polyphénoliques et des activités biologiques comparables, ainsi qu'ultérieurement un effet anthelminthique significatif sur la migration et le dégainement larvaires de *H. contortus*.

5.2. Test d'éclosion des œufs

Tout d'abord il apparaît important de préciser que les résultats pour le moins surprenants obtenus avec les extraits Oaxaca et Starbucks CS ne semblent pas tant pouvoir être reliés à l'activité biologique ou au contenu en composés phénoliques qu'à de plus probables erreurs de manipulation lors de la préparation ou la lecture des plaques, soulignant ainsi la technicité de la méthode et la nécessité d'y apporter le plus grand soin afin de parvenir à une répétabilité et ainsi une possible interprétation des résultats.

Si le protocole du test d'éclosion des œufs a récemment été standardisé par von Samson-Himmelstjerna *et al.* (2009) avec certaines espèces de nématodes parasites dont *H. contortus*, il l'est cependant uniquement dans le cas des anthelminthiques de synthèse (gamme de concentrations testées allant de 0,01 à 0,5 µg de thiabendazole/mL). C'est un processus qui reste difficile et qui nécessite une extrême rigueur (des différences mineures _comme la nature de l'eau utilisée par exemple_ peuvent en effet modifier considérablement les résultats observés). C'est pourquoi il n'est jamais acquis par avance de trouver du premier coup l'éventail optimal des concentrations de l'extrait dont on souhaite explorer les propriétés ATH. Ainsi il ne fut possible de travailler correctement qu'avec une seule concentration ici, ce qui n'est pas suffisant pour mettre en évidence la variabilité précédemment observée entre les extraits. Il serait nécessaire de répéter l'expérience afin d'affiner la série de concentrations permettant de calculer les EC₅₀. Les doses plus élevées ont cependant compromis la bonne lecture des plaques à cause des impuretés présentes en quantités excessives dans les prélèvements ; en conséquence, bien que Nieves-Guerrero *et al.* (2009) n'aient pas observé d'effet ATH significatif aux concentrations inférieures à 2 400 µg.mL⁻¹, cela ne nous laisse d'autre choix que de tester des extraits plus faiblement concentrés la prochaine fois.

On peut également faire remarquer que les résultats, même s'ils ne sont pas directement comparables car issus de tests *in vitro* distincts ne ciblant pas les mêmes stades parasitaires, confortent toutefois ceux de Nieves-Guerrero *et al.* (2009) avec l'extrait de Garat humide : à la concentration 2 400 µg.mL⁻¹, nos prédécesseurs ont effectivement trouvé un effet anthelminthique correspondant à 24% d'inhibition de la migration des L₃ de *H. contortus*. Ici, malgré une certaine variabilité concernant surtout deux extraits en particulier, la nette tendance à avoir un effet très marqué, ceci quelle que soit l'origine du café (80-90% d'inhibition de l'éclosion observée dans la grande majorité des puits), nous invite à aller plus loin dans l'interprétation des résultats en formulant l'hypothèse que les nématodes ne se trouvant naturellement pas à leur contact, ils sont donc particulièrement sensibles aux métabolites secondaires des extraits de marc de café (en effet à notre connaissance ce dernier n'est pas utilisé dans l'alimentation des petits ruminants). Ceci va dans le sens des résultats de Calderon-Quintal *et al.* (2010) suggérant que les nématodes seraient capables, en retour de l'ingestion de PRT par les petits ruminants, de développer des mécanismes d'adaptation pour survivre aux tanins : dans leur expérimentation *in vitro*, ils ont en effet montré que la souche de *H. contortus* la moins sensible des trois était celle ayant la même origine géographique que les plantes présentes normalement dans le régime de l'hôte et dont furent obtenus les extraits étudiés.

Diverses études utilisant des extraits de quebracho, de sulla ou de sainfoin ont identifié les tanins condensés comme étant les principaux composés responsables de l'effet anthelminthique observé (Molan *et al.*, 2000 ; Athanasiadou *et al.*, 2001 ; Barrau *et al.*, 2005). En revanche dans d'autres expérimentations conduites sur des plantes tropicales telles que *Lysiloma latisiliquum* et *Acacia pennatula*, l'activité biologique (mesurée par la production de gaz *in vitro*) s'est révélée avoir une relation plus affine avec le contenu en polyphénols qu'en TC (Getachew *et al.*, 2002 ; Alonso-Díaz *et al.*, 2008c). Ici malgré l'inconstance des PT, TC et AB entre les différents extraits, la relation de ces mesures avec les résultats du test d'éclosion n'est pas claire car les effets ATH observés sont similaires pour six des huit extraits étudiés. Face à ce phénomène, deux hypothèses peuvent être proposées :

- ✓ la première est que la variabilité de la nature et la structure chimique des tanins condensés, peut-être plus encore que leur seule concentration, est un facteur majeur modulant l'efficacité anthelminthique *in vitro* (Hoste *et al.*, 2006). De récentes études, en corrélant notamment le ratio prodelphinidols/procyanidols avec le niveau d'inhibition observé, ont en effet démontré le rôle du profil biochimique et des interactions complexes entre tanins (Molan *et al.*, 2003). Dans d'autres, les monomères des TC (notamment ceux des prodelphinidols comme l'épigallocatechine, ainsi que les dérivés gallatés des flavan-3-ols) ont affecté la migration et le dégagement larvaires de *H. contortus* et *T. colubriformis* (Brunet et Hoste, 2006 ; Brunet *et al.* 2008a). L'efficacité anthelminthique du marc de café pourrait être ainsi plus liée à la qualité de ses TC qu'à sa quantité, d'autant plus qu'à priori les parasites n'y ont pas encore été confrontés,

- ✓ la seconde est qu'en plus des tanins condensés interviennent directement d'autres substances dans l'effet anthelminthique observé. Barrau *et al.* (2005) ont par exemple confirmé l'implication d'hétérosides flavonoïdes (rutine, nicotiflorine et narcissine) dans les propriétés ATH du sainfoin. Il convient ainsi de garder à l'esprit qu'étant donné leur structure chimique particulière, la propriété de se fixer aux protéines (incluant celles des nématodes) n'est pas le privilège des seuls TC mais bien de tous les polyphénols de manière générale. Dans le cas du café, on peut ainsi tout aussi bien imaginer un effet ATH des acides chlorogéniques ou des unités flavaniques. Le rôle

d'autres métabolites secondaires n'est pas non plus exclu, le grain de café torréfié contenant des produits de la réaction de Maillard (mélanoidines par exemple) dont les propriétés réductrices seraient par ailleurs également évaluées par la méthode de Folin-Ciocalteu (Perez-Martinez *et al.*, 2010), ainsi que des terpènes (cafestol et kahweol, aux propriétés anticarcinogéniques démontrées). Tout ceci rend donc intéressante la perspective d'un fractionnement et d'une caractérisation plus fine des composés phénoliques et non phénoliques réellement présents dans le marc de café. Malgré la technicité et le coût prohibitifs des analyses requises pour une pareille étude, cela paraît toutefois envisageable si on considère ses applications possibles dans d'autres domaines ou encore l'importance de l'industrie et du marché de l'or vert.

Enfin, il est à noter que les deux derniers produits GARAT® Descafeinado et INTERNATIONAL® Descafeinado avaient été choisis notamment afin de voir l'influence éventuelle de la décaféination ; on peut reporter ici que les résultats observés ne permettent pas dans l'état actuel des choses de faire ressortir une répercussion particulière de ce processus sur l'activité athelminthique des extraits de marc de café.

Pour conclure, il serait souhaitable dans des essais futurs :

- ✓ d'une part d'employer du polyvinyl polypyrrolydone ou du polyéthylène glycol inhibiteurs de tanins, ceci afin de confirmer le rôle des tanins dans l'activité anthelminthique observée, comme cela a été fait précédemment (Alonso-Díaz *et al.*, 2008ab ; Calderon-Quintal *et al.*, 2010 ; Guerrero-Nieves *et al.*, 2009),

- ✓ d'autre part que l'effet observé sur *H. contortus* soit de même investigué avec un nématode intestinal comme *T. colubriformis* par exemple, ceci afin d'apprécier l'ampleur du spectre anthelminthique des extraits employés (Hoste *et al.*, 2008). En effet, plusieurs études antérieures ont rapporté une différence d'activité de mêmes PRT ou monomères de TC selon l'espèce parasitaire testée (Molan *et al.*, 2000 ; Brunet et Hoste, 2006).

TROISIÈME PARTIE : ÉTUDE *IN VIVO*

La consommation de matériaux d'origine végétale riches en tanins condensés a été associée à des effets néfastes sur les nématodes gastro-intestinaux et à une amélioration de la résilience de l'hôte vis-à-vis du parasitisme, montrant ainsi qu'ils représentaient une alternative prometteuse à l'emploi des anthelminthiques de synthèse pour la maîtrise du parasitisme gastro-intestinal. Malgré la variabilité intraspécifique des teneurs en composés phénoliques et tanins condensés du marc de café (et l'influence probable de facteurs liés à l'environnement, aux variétés génétiques ou aux modes de préservation technologique du matériau), les résultats obtenus *in vitro* se sont révélés plus qu'encourageants, avec un effet anthelminthique substantiel quelle que soit la source de tanins testée. C'est pourquoi il a été décidé de confirmer *in vivo* ces propriétés ATH et d'entreprendre une étude dans les conditions réelles d'un élevage, à savoir le troupeau de chèvres de la ferme expérimentale des petits ruminants de la Faculté Vétérinaire du Yucatán, dans le Sud-Est du Mexique. La distribution de marc de café a donc été testée en infestation naturelle et ses répercussions ont été estimées sur l'ingestion, le poids et le parasitisme des caprins. En effet, on ne peut envisager de proposer et d'appliquer de nouvelles méthodes de lutte à l'échelle des élevages sans s'être assuré au préalable que la santé et le bien-être des animaux ne pâtissaient pas d'effets collatéraux indésirables du traitement antiparasitaire mis à l'épreuve.

1. Objectif général

L'objectif général de cette seconde phase expérimentale a été de connaître l'effet de l'introduction de marc de café (*Coffea arabica*) dans l'alimentation sur l'état général, la consommation et l'excrétion parasitaire de chèvres de race Criollo infectées naturellement au pâturage par les nématodes gastro-intestinaux.

2. Objectifs spécifiques

De façon plus détaillée, les objectifs de cette étude ont donc été de :

- i) étudier *in vivo* l'effet de la supplémentation des caprins en marc de *C. arabica* sur l'évolution de l'excrétion des œufs de strongles digestifs. Mettre en évidence une éventuelle diminution de la charge parasitaire fécale par rapport au contrôle,
- ii) déterminer si l'éventuel effet anthelminthique de la supplémentation était associé à une espèce parasitaire en particulier, soit évaluer la spécificité d'action des tanins condensés sur l'éclosion et le développement des œufs de nématodes excrétés dans les fèces,
- iii) suivre l'effet de la supplémentation sur la consommation volontaire de l'aliment proposé aux animaux, et s'assurer ainsi de son appétence,
- iv) évaluer l'effet de la supplémentation sur l'état général des animaux, ce dernier pouvant refléter les conséquences physiologiques possiblement néfastes de l'ingestion excessive de tanins condensés,
- v) connaître la composition bromatologique exacte des aliments utilisés ainsi que leur contenu en composés phénoliques et leur activité biologique, et essayer de les mettre en relation avec les effets précédemment observés.

3. Matériel et méthodes

3.1. Zone d'étude

L'étude fut réalisée durant le mois de juillet 2011 sur le Campus des Sciences Biologiques et Agronomiques de la Faculté de Médecine Vétérinaire et de Zootechnie de Mérida, Yucatán, Mexico (N 22° 30', W 89° 30'). D'après le système de classification de Köppen modifié par Garcia (1988), le climat y est de type AW₀, c'est-à-dire tropical chaud et subhumide avec des pluies en été de juin à octobre. Les température et précipitation annuelles moyennes varient respectivement de 26 à 27,8 °C et de 940 à 1 100 mm.

3.2. Aliments utilisés

Un sac de 100 kg de concentré en grains (soja-sorgho 10%:90%) fut préparé par le personnel technique du département de nutrition. D'autre part, après séchage complet à 50 °C pendant 72 h, 17 kg d'un mélange de marc de cafés résiduels issus du processus de percolation purent finalement être rassemblés au terme d'un mois et demi de collecte quotidienne au sein du campus ainsi qu'après des différentes enseignes de la Starbucks Coffee Company de la ville de Mérida. Ces deux éléments de base, concentré et marc de café sec, furent par la suite soigneusement pesés (TECNOCOR® PEN-30C, 30kg x 10g) et homogénéisés afin d'obtenir trois aliments distincts, le premier constitué uniquement de concentré, les deux suivants comprenant respectivement 15 et 30% de marc de café (tableau 16).

Tableau 16. Composition des suppléments alimentaires employés (%).

Ingrédient	Aliment		
	lot 1	lot 2	lot 3
sorgho grain	90	76,5	63
graine de soja	10	8,5	7
marc de café sec	0	15	30

3.3. Analyses bromatologique, chimique et biologique

Des échantillons du marc de café seul ainsi que des aliments précédemment obtenus furent analysés au laboratoire de nutrition selon les procédures standards de la AOAC (AOAC, 1980) afin de déterminer matière sèche (MS), protéine brute (PB), extrait éthéré (graisses) et cendres. Fibre détergente neutre (FDN) et fibre détergente acide (FDA) furent également déterminées (van Soest *et al.*, 1991). D'autre part, le contenu en phénols totaux (PT) fut quantifié par la méthode de Folin-Ciocalteu (Makkar, 2003), la quantité de tanins condensés (TC) fut déterminée par le test de la vanilline (Price *et al.*, 1978) et l'activité biologique (AB) fut mesurée par le test de diffusion radiale développé par Hagerman (1987) et modifié par Reyes (1993).

3.4. Animaux et groupes expérimentaux

Dix-huit chèvres adultes Criollo, toutes habituées à pâturer dans la végétation native locale, furent choisies parmi la quarantaine de bêtes mises à la reproduction au sein du département des petits ruminants. Les animaux, âgés de 4 à 8 ans (moyenne $6,8 \text{ ans} \pm 1,2$) et mis à la reproduction depuis un mois à un mois et demi, présentaient avant le démarrage de l'expérience un poids moyen de $35,5 \text{ kg} \pm 4,3$ et une faible excrétion d'œufs de NGI ($<750 \text{ OPG}$, moyenne $300 \text{ OPG} \pm 142$). Ils furent identifiés au moyen de boucles en plastique de couleur et distribués ainsi en trois groupes homogènes au regard des moyennes d'âge, poids et excrétion parasitaire des animaux. Les données récoltées avant démarrage de l'expérimentation sont disponibles en annexe 2.

3.5. Mesure de la consommation volontaire

Contraints de respecter au maximum leur mode de conduite habituelle, les animaux furent emmenés pâturer dans les environs de la ferme tous les matins à 7 a.m. Au moment de rentrer vers 12 p.m., les animaux marqués furent séparés du reste du troupeau et transférés dans des enclos individuels de $2 \times 1 \text{ m}$ où leur fut proposé à chacun dans un seau en plastique 300 g de l'aliment correspondant à son groupe d'appartenance (groupe 1 contrôle / aliment 1...). L'eau fut mise à disposition *ad libitum* et les animaux ne furent reconduits à leur corral d'origine qu'une fois l'aliment entièrement consommé. Les quantités nouvellement offertes et refusées furent pesées au matin suivant à l'aide de la même balance utilisée pour la préparation des suppléments. Ce schéma fut ainsi répété quotidiennement durant 21 jours.

3.6. Monitoring de l'état général des animaux

Tout au long de l'expérimentation, il fut prêté une attention particulière à la manifestation de signes cliniques inhabituels (notamment abattement, excitation, perte d'appétit, diarrhée et déshydratation) pouvant être liée au changement brusque de régime et/ou notamment à l'inclusion d'une quantité inconnue de caféine dans la ration. D'autre part, le poids des animaux fut enregistré au début et à la fin de l'étude (J0 et J21, TORREY® CRS 500/1000, $500 \text{ kg} \times 0,2$) afin de détecter une éventuelle différence entre les groupes dans la prise de poids normalement attendue en période de saison des pluies.

3.7. Mesure de l'excrétion des œufs de nématodes gastro-intestinaux

Des échantillons de matières fécales (approximativement 3 à 5 g) furent prélevés par voie rectale entre 12 p.m. et 2 p.m. les jours -1, 5, 8, 11, 14, 17, 19 et 21 de l'expérimentation (le jour 1 correspondant au début de l'inclusion de marc de café dans l'alimentation des animaux). Conservés séparément dans des sachets en plastique identifiés, ils furent acheminés dans l'heure suivante au laboratoire de parasitologie afin d'être analysés selon la technique de McMaster (Rodríguez-Vivas et Cob-Galera, 2005) modifiée par Coles *et al.* (1992). Pour ce faire, 2 g de chaque échantillon furent pesés (Scout™ Pro SP601, $600 \text{ g} \times 0,1$) au sein d'un tamis surplombant une coupelle, puis mélangés dans 28 mL d'une solution sucrée saturée (densité $\geq 1,27$). Une fois le tamis retiré et le liquide restant homogénéisé, les deux chambres d'une lame de McMaster furent remplies à l'aide d'une seringue de 1 mL et observées à $\times 20$. On évalua le contenu des fèces en œufs par gramme de strongles digestifs en multipliant par 50 la somme totale des œufs rencontrés lors de la lecture. Ce procédé fut ainsi répété pour chaque animal et pour chaque jour de prélèvement, moyenne et écart-type étant enfin calculés pour chacun des trois groupes.

L'efficacité anthelminthique de chacun des deux " traitements " auxquels les animaux furent ainsi soumis fut enfin évaluée selon la méthode de Dash *et al.* (1988) servant habituellement à détecter la résistance ATH dans le test de réduction d'excrétion fécale des œufs (en anglais *faecal egg count reduction test*, FECRT) à partir de la formule suivante :

$$FECR (\%) = (1 - [T_{21}/T_{-1}] / [C_{21}/C_{-1}]) \times 100$$

Où : T_{-1} = OPG moyen du groupe traité (aliment 2 ou 3) à J-1,

T_{21} = OPG moyen du groupe traité à J21,

C_{-1} = OPG moyen du groupe contrôle (aliment 1) à J-1,

C_{21} = OPG moyen du groupe contrôle à J21.

3.8. Coprocultures, récupération et classification des larves

Le dernier jour de l'expérimentation (J21), des échantillons fécaux de chacun des trois groupes (1 à 2 g par animal) furent mis en culture selon la technique de Corticelli et Lai (1963) : placés dans une première boîte de Petri (10 cm de diamètre, sans couvercle) elle-même contenue dans une autre boîte contenant environ 1 cm de hauteur d'eau (15 cm de diamètre, avec couvercle), ils furent homogénéisés et humidifiés jusqu'à atteindre une texture adéquate. Ils furent ensuite mis à incuber dans une étuve bactériologique à 27 °C pendant 7 à 8 jours, en prenant soin de les aérer quelques minutes quotidiennement afin de permettre aux œufs de nématodes d'éclore et de se développer jusqu'au stade L₃. Au terme de l'incubation, la première boîte fut retournée dans la plus grande et le jour suivant, le procédé ayant permis à la majeure partie des larves de passer dans l'eau grâce à leur hygrotropisme positif, la suspension des larves fut récupérée, concentrée par centrifugation (1 500 rpm pendant 5 min) et stockée à 4 °C jusqu'à l'identification de sa composition générique. Cette dernière fut réalisée à x40 et x100 d'après la méthode de Bowman (2009) qui se base sur deux principales différences morphologiques rencontrées entre les larves de NGI, à savoir la longueur de la gaine de la queue et la forme de la tête.

3.9. Analyses statistiques

Le gain de poids fut analysé avec le logiciel Statgraphics® Centurion XV au moyen d'une analyse de variance à un facteur et les moyennes des différents groupes furent ensuite comparées en faisant un test post-hoc de Tukey.

L'excrétion parasitaire fut analysée avec le logiciel SAS® 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2002 - 2003) utilisant un modèle de mesures répétées fondé sur la formule générale suivante :

$$Y_{ijk} = M + T_i + A_{j(i)} + J_k + (T \times J)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Où : Y_{ijk} = la variable dépendante,

M = la moyenne générale,

T_i = l'effet du traitement i,

$A_{j(i)}$ = l'effet de l'animal j soumis au traitement i,

J_k = l'effet du jour k,

$(T \times J)_{ik}$ = l'effet de l'interaction entre le traitement i et le jour k,

ε_{ijk} = l'erreur résiduelle.

Un test du khi-deux (χ^2) fut enfin effectué afin de vérifier l'hypothèse nulle d'indépendance des variables " groupe " et " genre parasitaire " dans les résultats des coprocultures.

4. Résultats

4.1. Analyses bromatologique, chimique et biologique

Les taux de protéine brute, de lipides et de fibres sont élevés dans le cas du marc de café pur. Le concentré quant à lui présente une faible teneur en phénols totaux et en tanins condensés. Malgré la présence de PT et TC en pourcentages non nuls, aucune réaction visible de précipitation protéique ne fut observée à l'issue du test de diffusion radiale (tableau 17).

Tableau 17. Analyses des suppléments utilisés dans l'alimentation des groupes expérimentaux (% calculés sur une base sèche, exceptée la MS exprimée en % de matière fraîche).

Aliment	MS	PB	Graisses	FDN	FDA	Cendres	PT	TC	AB
Concentré	82,18	18,26	5,37	38,80	21,17	7,05	1,97	0,49	-
15% café	84,90	17,58	7,75	41,34	24,05	6,17	3,58	0,82*	-
30% café	86,84	16,95	9,78	46,44	23,98	5,49	4,96	1,15*	-
100% café	93,94	14,36	19,70	52,26	29,75	1,89	11,95	2,69	-

* valeurs calculées

4.2. Consommation volontaire et état général des animaux

À l'exception d'un animal du groupe 3 ayant délaissé 200 g de l'aliment proposé le jour 3 de l'expérimentation, il n'y eut aucun autre refus le reste du temps. L'aliment fut tout de suite bien accepté par le groupe contrôle. En revanche chez certains animaux des deux autres groupes et plus particulièrement du numéro 3, il fut observé un temps de consommation sensiblement plus long les premiers jours : ainsi les dernières des deux à six bêtes réticentes ne furent parfois ramenées auprès de leurs semblables qu'en fin d'après-midi, soit deux à trois heures plus tard que le reste de leurs congénères. Cependant cette tendance s'estompa rapidement en une semaine et par la suite la conduite des animaux (tri du reste du cheptel à la rentrée du pâturage / alimentation individuelle par rotation des groupes étant donnée la disponibilité de seulement 12 enclos pour l'ensemble des 18 bêtes / retour avec le reste du troupeau en présence du mâle reproducteur) put être menée à bien en deux à trois heures à peine selon les jours et la nécessité ou non de prélèvements.

D'autre part, exceptés deux animaux du groupe 3 ayant perdu quelques centaines de grammes en l'espace de trois semaines (dont celui ayant refusé une fois une bonne partie de l'aliment en début d'expérience), tous les autres virent leur poids augmenter en moyenne de $2,7 \text{ kg} \pm 0,9$, sans toutefois qu'il y ait une différence statistiquement significative entre les groupes ($P=0,45$) (tableau 18).

Tableau 18. Évolution du poids des animaux entre le début et la fin de l'expérience (moyenne \pm écart-type en kg). Les différences entre les groupes ne sont pas significatives ($P>0,05$).

Groupe	Poids moyen initial J0	Poids moyen final J21	Différence moyenne J21-J0
1 Contrôle	$34,8 \pm 5,2$	$37,4 \pm 5,2$	$2,7 \pm 0,7^a$
2 15 % café	$35,3 \pm 4,9$	$37,9 \pm 4,5$	$2,5 \pm 1,3^a$
3 30% café	$36,4 \pm 3,2$	$38,1 \pm 4,0$	$1,8 \pm 1,7^a$

Les valeurs avec des lettres distinctes au sein d'une même colonne diffèrent à $P<0,05$.

Quant à l'état clinique des animaux étudiés, aucun trouble particulier ne fut remarqué lors de leur maniement quotidien pour les besoins de l'expérience, ni rapporté par les employés de la ferme les accompagnant et observant paître durant toutes les matinées.

4.3. Excrétion des œufs de nématodes gastro-intestinaux et résultats des coprocultures

Les résultats du suivi de l'excrétion parasitaire des animaux sont disponibles en annexe 3. La charge parasitaire fécale des animaux est restée relativement peu élevée tout au long de la période d'étude, avec une excrétion individuelle ne dépassant jamais 2 000 œufs par gramme et rarement 750. Les moyennes maximales d'OPG furent atteintes en fin d'expérience, avec des valeurs un peu plus élevées pour le groupe contrôle (700-800 OPG) par rapport aux deux autres (400-600 OPG). Les pourcentages de réduction du nombre d'œufs fécaux entre les jours -1 et 21 furent respectivement de 25 et 27% pour les groupes 2 et 3, sans toutefois que cette différence soit statistiquement liée à l'effet de la supplémentation ($P=0,52$).

Dans les prélèvements réalisés, *Haemonchus sp.*, *Trichostrongylus sp.* et *Oesophagostomum sp.* furent retrouvés chez les trois groupes en proportions non négligeables, *Haemonchus sp.* étant le genre prédominant dans tous les cas (39 à 49% du nombre total de L₃ comptabilisées). Le χ^2 calculé (42,998) étant d'autre part supérieur à la valeur théorique attendue pour quatre degrés de liberté au seuil de 0,05 (9,488), il permet de conclure qu'il existe une relation statistique significative entre la composition générique des parasites retrouvés dans les fèces et le traitement auquel l'animal a été soumis. Relativement au groupe contrôle, on observe ainsi chez ceux ayant consommé 15 et 30% de marc de café une nette diminution du pourcentage de larves écloses de *Trichostrongylus sp.* (-20 et -75%) au profit de celles de *Oesophagostomum sp.* (+200 et +400%) (tableau 19).

Tableau 19. Composition générique de la communauté de larves de nématodes gastro-intestinaux écloses et observées dans les prélèvements fécaux des caprins en fin d'expérience (%). Les rapports *Trichostrongylus/Oesophagostomum* sont singulièrement inversés entre les groupes 1 et 2.

Groupe		Genre de NGI	% de L ₃
1	Contrôle	<i>Haemonchus sp.</i>	49
		<i>Trichostrongylus sp.</i>	42
		<i>Oesophagostomum sp.</i>	9
2	15% café	<i>Haemonchus sp.</i>	44
		<i>Trichostrongylus sp.</i>	11
		<i>Oesophagostomum sp.</i>	45
3	30% café	<i>Haemonchus sp.</i>	39
		<i>Trichostrongylus sp.</i>	34
		<i>Oesophagostomum sp.</i>	27

5. Discussion

Si la taille des groupes respecte les minima recommandés ($n=5$) pour pouvoir effectuer des comparaisons statistiques et des interprétations chiffrées valides, les effectifs étudiés n'en restent pas moins très faibles et il est évident qu'obtenir des résultats significatifs dans ces conditions n'est pas chose aisée. Cet inconvénient répond cependant à une contrainte logistique incompressible, le manque de places disponibles pour tous les animaux, ce qui n'a par ailleurs pas empêché le bon déroulement de l'expérience selon le protocole initialement prévu. Un autre désavantage, lié cette fois au mode de conduite des caprins, est qu'il ne fut pas possible d'effectuer les prélèvements le matin, alors que c'est à ce moment de la journée que l'on observe habituellement une intensité maximale d'excrétion des oeufs dans les fèces (Torres-Acosta, communication personnelle).

5.1. Analyses bromatologique, chimique et biologique

On peut trouver deux explications possibles à l'échec total du test de diffusion radiale et de mesure de l'activité biologique :

- ✓ une erreur de manipulation lors de la préparation du gel d'agarose a pu conduire par exemple à un pH défavorable à la complexation des tanins avec l'hémoglobine,

- ✓ l'incubation des boîtes de Pétri s'est faite à température ambiante, c.à.d. à une température largement supérieure dans le contexte du Yucatán aux 25 °C décrits dans le protocole de Reyes (1993). Les propriétés de l'agar ont ainsi pu être modifiées, empêchant la bonne diffusion et liaison des tanins avec les protéines.

5.2. Consommation volontaire et état général des animaux

Les difficultés initiales de consommation volontaire des groupes 2 et 3 sont probablement plus à mettre en relation avec les caractéristiques organoleptiques pour le moins inhabituelles sinon inappétentes du café, qu'avec les taux de fibres similairement élevés dans les trois aliments, ou les effets antinutritionnels précédemment évoqués des tanins (teneur en TC ~ 1% ici).

L'absence de différence significative dans la prise de poids entre les groupes laisse supposer que le café n'a pas eu d'effet nutritionnel néfaste sur les animaux ; cependant, les résultats négatifs des études *in vivo* précédentes (Bartley *et al.*, 1978 ; Givens et Barber, 1986 ; Xu *et al.*, 2007) associés à la courte durée de la présente expérience et à la perte de poids enregistrée au sein du groupe 3 (même si cette dernière est faible, ne trouve pas d'explication clinique apparente et ne concerne que 1/3 des individus), invitent à considérer avec précaution ces résultats statistiques. D'autre part, en termes de sensibilité et de spécificité, le changement de poids vif est loin d'être le meilleur indicateur de performance chez les animaux adultes. Il serait peut-être bon d'envisager une étude ainsi plus approfondie en associant, en plus du monitoring de l'activité ATH, la mesure de la digestibilité des aliments comportant des pourcentages croissants de marc de café, ceci afin de déterminer jusqu'à quel point les animaux peuvent le tolérer et maintenir un niveau satisfaisant d'entretien et de production, tout en conciliant effet bénéfique ATH et effet indésirable antiphysiologique.

La caféine n'est pas dégradée par les microorganismes du rumen ; elle est en fait métabolisée dans le foie par les enzymes du cytochrome P450 (Aguiar et Wink, 2005). Bien que ses effets chez les ruminants n'aient été étudiés qu'indirectement au travers de leur alimentation avec la coque ou la pulpe de café, Cabezas *et al.* (1987) suggèrent que, tout comme chez les autres Mammifères, la caféine est un stimulant du système nerveux central et à hautes doses de la diurèse, ce dernier point entraînant une

diminution de la fixation de l'azote et donc des performances de production. Les résultats de notre étude, montrant l'absence apparente de manifestation de tels effets chez les animaux, suggèrent que la caféine est ingérée à des doses faibles sans répercussion sur leur état de santé. On peut également formuler l'hypothèse que cet alcaloïde est en bonne partie éliminé avec l'eau lors du processus de préparation de la boisson, et qu'il est ainsi présent dans le marc résiduel dans de faibles proportions non toxiques pour les animaux (0,5% dans le marc de *C. Arabica* d'après Ramalakshmi *et al.*, 2009). Par ailleurs il est à signaler que l'extraction à l'eau chaude est justement l'une des méthodes actuellement employées dans le processus de décaféination, à côté de l'extraction par les solvants organiques ou par le dioxyde de carbone supercritique.

5.3. Excrétion des œufs de nématodes gastro-intestinaux et résultats des coprocultures

Face à l'absence d'effet significatif de la supplémentation sur l'excrétion parasitaire, plusieurs objections et remarques peuvent être formulées :

✓ la durée de l'expérience fut limitée à trois semaines. Cependant, en seulement huit jours une diminution significative des OPG ainsi que de la taille et de la fécondité des femelles de *H. contortus* put être associée chez des moutons à la consommation de *Lysiloma latisiliquum* (Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*, 2010). D'un autre côté, toujours avec des moutons mais supplémentés cette fois pendant treize jours avec *Havardia albicans* (une autre légumineuse tropicale), l'effet sur l'excrétion fécale des œufs ne fut pas évident, bien que longueur et fertilité des femelles furent significativement réduites (Hugo *et al.*, à paraître). Ainsi, sans avoir pu le vérifier *in situ* en sacrifiant les animaux de l'étude, il n'est toutefois pas exclu que la consommation de marc de café ait affecté la biologie des vers adultes déjà établis ou empêché l'installation de nouvelles infections larvaires (Brunet *et al.*, 2008b), effets qui n'auraient pas été perçus avec les seuls niveaux d'OPG,

✓ on peut également se demander si les résultats auraient été différents en travaillant avec des ovins. Même si jusqu'à présent, personne n'a directement comparé dans le même protocole l'effet d'une même source de tanins condensés sur les nématodes gastro-intestinaux entre les deux espèces de petits ruminants, les conditions voisines de certaines études suggèrent en effet l'existence de divergences d'activité anthelminthique des TC en fonction de l'hôte. Ainsi en infestation naturelle, la consommation de sulla (*Hedysarum coronarium*) a induit une réduction de la charge parasitaire chez les ovins (Niezen *et al.*, 1998a) mais pas chez les caprins (Pomroy et Adlington, 2006). Cette différence pourrait s'expliquer notamment par les adaptations physiologiques de ces derniers, la sécrétion de protéines salivaires particulières conduisant au piégeage et à la diminution de la quantité de TC libres dans le tractus digestif,

✓ les concentrations de polyphénols et de tanins condensés dans les aliments étaient trop faibles pour avoir un effet antiparasitaire marqué. Chez les auteurs précédemment évoqués et pour lesquels les résultats d'excrétion des œufs ne furent pas non plus significatifs (Hugo *et al.*, à paraître ; Méndez-Ortíz *et al.*, à paraître), les animaux consommaient moins de 3g de TC/j/kg PV. Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.* (2010) ont quant à eux observé une diminution significative associée à l'ingestion de 4,2g de TC/j/kg PV. Par comparaison dans notre expérience, les concentrations apportées par les aliments furent effectivement très basses (estimées à moins de 0,1 g/j/kg PV), même s'il n'est pas possible d'évaluer les apports supplémentaires certainement procurés aux animaux lors de leur pâturage dans la végétation native riche en légumineuses tropicales,

✓ les écarts-types sont systématiquement élevés et indiquent une grande variabilité des OPG entre les animaux au sein des groupes, suggérant ainsi d'augmenter si possible la taille des échantillons dans de futurs essais,

✓ enfin, si l'on considère les recommandations de Coles *et al.* (1992) de travailler avec des matières fécales contenant au moins 100 OPG, on peut éventuellement invoquer les variations d'intensité d'excrétion ou encore les charges parasitaires trop faibles de certains animaux, et par conséquent une sensibilité moins bonne de la technique modifiée de McMaster.

En résumé, ces résultats non significatifs peuvent être liés à : la petite taille des groupes, la courte durée de l'expérience, l'espèce hôte étudiée, le manque de sensibilité de l'indicateur employé pour mesurer le parasitisme des animaux (OPG), les faibles teneurs en TC des suppléments utilisés.

D'autre part, les résultats des coprocultures et de l'excrétion parasitaire suggèrent que l'effet anthelminthique _s'il existe toutefois_ se ferait préférentiellement sur *Trichostrongylus sp.*, soit sur l'éclosion des œufs (à l'extérieur de l'hôte), soit sur la fertilité des femelles adultes et la production des œufs dans l'hôte. L'hypothèse est cependant à considérer avec précaution car si la distribution de marc de café semble modifier significativement la composition parasitaire fécale, il ne faut pas oublier que ces résultats sont le fruit d'une analyse unique qui ne dit notamment pas si la différence ainsi mise en évidence évolue avec le facteur " temps ". Avant de pouvoir obtenir de réelles certitudes, tout ceci demanderait donc à être corroboré par des expériences supplémentaires effectuant des mesures répétées et employant des méthodes d'examen plus invasives (autopsie de certains animaux pour la récupération et l'étude des vers adultes).

Pour conclure, bien que le contexte ne nous ait pas laissé le choix quant à la manière de valoriser l'utilisation du marc de café, cette étude soulève la question suivante : à supposer qu'on parvienne finalement à confirmer l'effet anthelminthique *in vivo*, peut-on sincèrement imaginer incorporer par la suite le marc de café directement sous cette forme dans l'alimentation des petits ruminants ? Malgré le fait que les caprins aient rapidement et relativement bien accepté le nouvel aliment proposé, cela paraît toutefois peu probable au vu de la valeur alimentaire médiocre du matériau mise en évidence dans les études précédentes, ainsi qu'au vu de la teneur limitée en tanins condensés de la ration ainsi constituée. Mieux vaudrait sans doute considérer son utilisation sous forme d'extrait de marc de café produit de manière industrielle, ou bien sous forme d'ensilage (Hoste *et al.*, 2008). Dans ce dernier cas, il est intéressant de noter que Xu *et al.* (2007) ont obtenu des résultats très encourageants, avec une bonne qualité de fermentation et de préservation de leurs ensilages préparés avec 10 ou 20% de marc de café humide. Ils préconisent par ailleurs ce mode de distribution pour :

✓ diminuer la production des effluents et améliorer la préservation d'un matériel végétal possédant initialement un fort taux d'humidité, le séchage du marc frais étant très coûteux en temps et en énergie,

✓ rendre le matériel plus appétent et ainsi augmenter sa consommation par les animaux.

CONCLUSION

L'étude *in vitro* de différents extraits tanniques de marc de café a montré la présence de tanins condensés et autres polyphénols en concentrations variables, associée à des activités biologique (précipitation des protéines) et anthelminthique (inhibition de l'éclosion des œufs) marquées contre *Haemonchus contortus*. L'efficacité ATH pourrait s'expliquer par le fait que le matériel végétal employé représente une source nouvelle de composés bioactifs contre lesquels les nématodes n'ont pas encore développé de mécanismes d'adaptation et de résistance. Il est nécessaire, d'une part, de confirmer l'implication des tanins par l'emploi d'inhibiteurs, d'autre part, de vérifier si l'effet ATH est également trouvé avec d'autres tests *in vitro* et d'autres espèces de nématodes. D'autres composés phénoliques et métabolites secondaires pourraient également être impliqués, ce qui demande des analyses plus poussées.

Concernant l'étude *in vivo*, l'introduction de marc de café dans l'alimentation a été globalement bien acceptée et n'a pas entraîné d'effet visiblement néfaste sur la santé des animaux. En revanche, elle n'a pas eu d'effet significatif sur l'excrétion parasitaire et demanderait en conséquence une étude ultérieure plus poussée (sur plusieurs mois, avec autopsie d'animaux en fin d'expérience) et dans des conditions mieux contrôlées. S'il s'avère finalement que le matériel peut être intégré dans la lutte contre le parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants, il est recommandé de l'utiliser à l'avenir sous forme d'extrait acétonique ou d'ensilage.

Dans la lignée du travail réalisé ici, les perspectives de recherches futures sont les suivantes :

- ✓ les tests *in vitro* doivent être repris et poursuivis afin d'obtenir les EC₅₀, d'une part, dans le cas du test d'éclosion (à cette fin, il est d'ailleurs recommandé d'utiliser la série de concentrations 600, 1 200, 1 800, 2 400, 3 000), et, d'autre part, afin de pouvoir comparer les différentes techniques d'évaluation des effets anthelminthiques d'extraits de plantes riches en tanins condensés. En effet, Alonso-Díaz *et al.* (2008a), en comparant deux de ces tests sur une même souche de *H. contortus*, ont reporté pour la première fois des résultats contradictoires entre dégainement (inhibition marquée du processus) et migration larvaire (pas d'effet significatif), en utilisant un même extrait de *Piscidia piscipula*. Ceci indique clairement une possible différence de sensibilité entre les tests *in vitro*,

- ✓ une investigation de terrain plus poussée devrait avoir cours sur le campus de la Faculté de Médecine Vétérinaire et de Zootechnie de Mérida, avec cette fois des conditions expérimentales d'infestation par *H. contortus*. Les jeunes caprins étudiés seraient gardés en cages métaboliques afin de mesurer la matière sèche excrétée et ainsi calculer la digestibilité apparente de la MS. D'autre part, l'autopsie d'animaux est également prévue afin de déterminer le nombre, la longueur et la fertilité des parasites adultes récupérés de l'abomasum. Ceci devrait permettre de mettre en évidence les propriétés anthelminthiques *in vivo*, d'étudier les mécanismes d'action sur les nématodes et de s'assurer de la sécurité d'utilisation du marc de café avant de pouvoir finalement conclure quant à son intégration potentielle dans le contrôle des nématodes gastro-intestinaux dans les systèmes de production de petits ruminants.

Il apparaît également important de rappeler la nécessité d'une approche intégrée (c.à.d. basée sur la combinaison de solutions reposant sur différents principes et niveaux de contrôle) dans le contrôle du parasitisme gastro-intestinal des ruminants, la seule

lutte chimique systématiquement pratiquée ces cinquante dernières années ayant désormais largement montré et atteint ses limites (Hoste et Torres-Acosta, 2011).

Enfin, il est à noter que si les résultats obtenus dans cette étude sont pour le moins encourageants, ils sont toutefois loin de l'être autant que ceux des récents travaux de Bravo *et al.* (2011), qui ont conclu que leurs extraits de marc de café étaient une source importante d'antioxydants naturels dont les propriétés conservatives et fonctionnelles pouvaient être valorisées dans l'industrie alimentaire en tant qu'ingrédients ou additifs. Des activités antitumorale et antiallergénique ont d'autre part été démontrées lors des recherches de Ramalakshmi *et al.* (2009). Enfin Kondamudi *et al.* (2008) indiquent que les 15% d'huiles contenues dans le marc de café peuvent être efficacement converties en biodiesel et le déchet issu de l'extraction utilisé comme combustible. Par conséquent, on peut raisonnablement craindre que le rôle du marc de café dans la Santé Animale soit considéré comme secondaire et effacé par les potentiels qu'il représente dans le domaine tout aussi majeur de la Santé Publique ainsi que dans celui de l'industrie des biocarburants.

BIBLIOGRAPHIE

- Aguiar R and Wink M.** (2005) Do naive ruminants degrade alkaloids in the rumen? *Journal of Chemical Ecology*. **31**(4), 761-787.
- Akkari H, Darghouth MA, Ben Salem H.** (2008) 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 Rum. Res.* **74**(1-3), 78-83.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Hoste H.** (2008a) *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *H. contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet. Parasitol.* **153**(3-4), 313-9.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal CM, Brunet S, Hoste H.** (2008b) Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet. Parasitol.* **153**(1-2), 187-92.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Aguilar-Caballero AJ, Capetillo-Leal CM.** (2008c) Is goats' preference of forage trees affected by their tannin or fiber content when offered in cafeteria experiments? *Animal Feed Science and Technology*. **141**, 36-48.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal CM.** (2010a) Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods. *Trop. and Subtrop. Agroecosystems*. **12**, 649-656.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H.** (2010b) Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: A friendly foe? *Small Ruminant Research*. **89**, 164–173.
- AOAC.** (1980) Official Methods of Analysis. 13th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA, 1038 p.
- Altaf H, Nisar Khan M, Iqbal Z, Sohail Sajid M, Kasib Khan M.** (2011) Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. *Vet. Parasitol.* **179**, 92–99.
- Athanasiadou S, Tzamaloukas O, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL.** (2005) Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Vet. Parasitol.* **127**(3-4), 233-243.
- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL.** (2001) 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.
- Aziz MA.** (2010) Present status of the world goat populations and their productivity. *Lohmann Information*. **45**(2), 42-52.

- Barnes EH, Dobson RJ, Barger IA.** (1995) Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today*. **11**(2), 56-63.
- 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 TN and McNabb WC.** (1999) The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*. [en-ligne] **81**, 263–272.
[<http://journals.cambridge.org/>] (consulté le 23/08/11)
- Bartley EE, Ibbetson RW, Chyba LJ, Dayton AD.** (1978) Coffee Grounds II. Effects of Coffee Grounds on Performance of Milking Dairy Cows and Feedlot Cattle, and on Rumen Fermentation and Dry Matter Removal Rate. *Journal of Animal Science*. [en ligne] **47**(4), 791-799.
[<http://jas.fass.org/content/47/4/791.full.pdf>] (consulté le 12/07/11)
- Bath GF and van Wyk JA.** (2009) The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. *Small Rumin. Res.* **86**, 6-13.
- Borreani G, Peiretti PG, Tabacco E.** (2003) Evolution of yield and quality of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) in the spring growth cycle. *Agr. for Sust. Developement*. **23**, 193-201.
- Bowman D.** (2009) Georgis' Parasitology for Veterinarians. 9th Edition. Missouri, USA: Saunders Elsevier, p. 157-162.
- Bravo J, Monente C, Juárez I, De Peña MP, Cid C.** (2011) Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*. Sous presse.
- Brunet S.** (2008) Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. Thèse (Dr. Pathologie et Nutrition), Toulouse : Université Paul Sabatier, 246 p.
- Brunet S and Hoste H.** (2006) Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J Agric Food Chem.* **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, Jackson F, Hoste H.** (2008a) Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* **38**(7), 783-790.
- Brunet S, Martínez-Ortíz-de-Montellano C, Torres-Acosta JF J, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Capetillo-Leal C and al.** (2008b) Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*. **157**, 81-88.

- Bruneton J.** (2009) Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. 4^e éd., revue et augmentée. Paris, France : Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
- Burke JM, Miller JE, Olcott DD, Olcott BM, Terrill TH.** (2004) Effect of copper oxide wire particles dosage and feed supplement level on *Haemonchus contortus* infection in lambs. *Vet. Parasitol.* **123**, 235–243.
- Burke JM, Miller JE, Larsen M, Terrill TH.** (2005) Interaction between copper oxide wire particles and *Duddingtonia flagrans* in lambs. *Vet. Parasitol.* **134**, 141–146.
- Cabezas MT, Flores A, Egana JL.** (1987) Use of coffee pulp in ruminant feeding. In: Brahan JE, Bressani R (Ed.) Coffee pulp: composition, technology, and utilization. Guatemala City: Institute of Nutrition of Central America and Panama, p 25-38.
- Calderón-Quintal JA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Alonso MA, Hoste H, Aguilar-Caballero A.** (2010) Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible? *Arch Med Vet.* [en-ligne] **42** : 165-171.
[<http://www.scielo.cl/pdf/amv/v42n3/art07.pdf>] (consulté le 27/08/2011)
- Casillas-Aguilar JAC, De Gives PM, López-Arellano ME, Hernández EL.** (2008) Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1149**, 161-163.
- Cenci FB, Louvandini H, Mcmanus CM, Dell'porto A, Costa DM, Araujo SC and al.** (2007) Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Vet. Parasitol.* **144**(1-2), 132-137.
- Chauvin A et Vermesse R.** (2009) Parasit'Info: un système expert d'aide à la gestion du risque des strongyloses digestives et de la fasciolose en élevage bovin. *Le Point Vétérinaire.* **40** N° Spécial : 29–30.
- Clifford MN and Ramirez-Martinez JR.** (1991) Tannins in Wet Processed Coffee Beans and Coffee Pulp. *Food Chemistry.* **40**, 191-200.
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Geerts S, Klei TR, Taylor MA and al.** (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **44**, 35–44.
- Corticelli B y Lai M.** (1963) Ricerche sulla tecnica di coltura delle larve infestive degli strongili gastro-intestinali del bovino. *Acta Medica Veterinaria*, año 9, fasc. V/VI.
- Dash K, Hall K, Barger IA.** (1988) The role of arithmetic and geometric worm egg counts in faecal egg count reduction test and in monitoring strategic drenching programs in sheep. *Aust. Vet. J.* **65**, 66-68.
- Encyclopaedia Universalis.** Carte Mexique. [en-ligne] Mise en ligne 2010.
[<http://www.universalis.fr/atlas/amerique-du-nord/mexique/>] (consulté le 25/11/11)
- Esquivel P and Jiménez VM.** (2011) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International.* Sous presse. [en-ligne]
[<http://www5.ocn.ne.jp/~ajca/cosic23.6-20.pdf>] (consulté le 06/09/2011)

FAO. (2003) Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina [en-ligne] Estudio FAO Producción y Sanidad Animal n°157. Roma, Italia, 64 p. [<http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4813S/y4813s03.htm>] (consulté le 03/12/11)

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [en-ligne] Mise à jour 2011. [<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>] (consulté le 06/09/2011)

Farah A and Donangelo CM. (2006) Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* **18**(1), 23-36.

FAS/USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. [en-ligne] Mise à jour 2011. [<http://www.fas.usda.gov/>] (consulté le 06/09/2011)

Garcia E. (1988) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Offset Larios, Mexico, D.F.

Getachew G, Makkar HPS, Becker K. (2002) Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *Journal of Agricultural Science.* **139**(3), 341-352.

Givens DI and Barber WP. (1986) *In vivo* evaluation of spent coffee grounds as a ruminant feed. *Agricultural Wastes.* **18**(1), 69-72.

González-Garduño R, Torres-Hernández G, Nuncio-Ochoa MGJ, Cuéllar-Ordaz JA, Zermelo-García ME. (2003) Detección de eficiencia antihelmíntica en nemátodos de ovinos de pelo con la prueba de reducción de huevos en heces. *Livestock Research Rural Development.* [en-ligne] **15**(12). [<http://www.lrrd.org/lrrd15/12/gonza1512.htm>] (consulté le 12/10/2011)

Hagerman AE. (1987) Extraction of tannins from fresh and preserved leaves. *Journal of Chemical Ecology.* **14**, 453-461.

Hale M, Burke JM, Miller JE, Terrill TH. (2007) Tools for Managing Internal Parasites in Small Ruminants: Copper Wire Particles. In: NCAT/ATTRA and Southern Consortium for Small Ruminant Parasite Control. [en-ligne] [<http://www.ansc.purdue.edu/>] (consulté le 16/11/2011)

Harder A, Schmitt-Wrede HP, Krücken J, Marinovski P, Wunderlich F, Willson J and al. (2003) Cyclooctadepsipeptides—an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. *Int. J. of Antimicrobial Agents.* **22**, 318-331.

Haslam E. (1989) Plant polyphenols - Vegetal tannins revisited. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 230 p (BioEssays, volume 12).

Heckendorn F, Häring DA, 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. *Vet. Parasitol.* **142**(3-4), 293-300.

Heckendorn F, Haring DA, Maurer V, Senn M, Hertzberg H. (2007) Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* **146**(1-2), 123-134.

Hernández-Orduño G, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Reyes-Ramirez RR, Hoste H and al. (2008) *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gaudieri*, *Havardia albicans* and quebracho tannin extracts on a mexican strain of *H. contortus* L3 larvae. *Trp. and Subtrp. Agroecosystems*. [en-ligne] **8**, 191-197. [<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/939/93980209.pdf>] (consulté le 14/09/2011)

Ho Bunyeth and Preston TR. (2006) Growth performance and parasite infestation of goats given cassava leaf silage, or sun-dried cassava leaves, as supplement to grazing in lowland and upland regions of Cambodia. *L. Rsch for Rural Dvlpt.* [en-ligne] **18** (2). [<http://www.mekarn.org/procsr/buny.pdf>] (consulté le 05/12/2011)

Hosking BC, Kaminsky R, Sager H, Rolfe PF, Seewald W. (2010) A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an aminoacetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol Res.* **106**, 529–532.

Hoste H and Torres-Acosta JFJ. (2011) Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Vet. Parasitol.* **180**(1-2), 144-154.

Hoste H, Gaillard H, Le Frileux Y. (2005) Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats. *Small Rum. Res.* **59**(2-3), 265-271.

Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. (2006) The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* **22**(6), 253-261.

Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Alonso-Díaz MÁ, Brunet S, Sandoval-Castro C, Houzangbe Adote S. (2008) Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Tropical biomedicine.* **25**(suppl), 56-72.

Houzangbe-Adote S, Paolini V, Fouraste I, Moutairou K, Hoste H. (2005a) *In vitro* effects of four tropical plants on threelife-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research Veterinary Science.* **78**, 155-160.

Houzangbe-Adote S, Paolini V, Fouraste I, Moutairou K, Hoste H. (2005b) *In vitro* effects of four tropical plants on the intestinal parasitic nematode, *Trichostrongylus colubriformis*. *Journal Helminthology.* **79**, 29-33.

Hounzangbe-Adote S, Zinsou FE, Hounpke V, Moutairou K, Hoste H. (2005c) *In vivo* effects of fagara leaves on sheep infected with gastrointestinal nematodes. *Tropical Animal Health Production.* **37**, 205-214.

Hunt PW, Mc Ewan JC, Miller JE. (2008) Future perspectives for the implementation of genetic markers for parasite resistance in sheep. *Trop. Biomed.* **25**, 18–33.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [en-ligne] Mise à jour 2011. [<http://www.inegi.org.mx/default.aspx?>] (consulté le 07/06/2011)

Jackson F and Coop RL. (2000) The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parásitology.* **120**, 95-97.

- Jacquet P, Barillet F, Bouix J, François D, Moreno C, Terefe G.** (2009) Genetic resistance of sheep to gastrointestinal strongyles. *Bull. Acad. Vet.* **162**, 39-46.
- Jean-Blain C.** (1998) Aspects nutritionnels et toxicologiques des tannins. *Revue de Médecine Vétérinaire.* **149**, 911-920.
- Kabasa JD, 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. *Trop. Anim. Health Prod.* **32**(2), 73-86.
- Kahiya C, Mukaratirwa S, Thamsborg SM.** (2003) Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitol.* **115**(3), 265-274.
- Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J and al.** (2008a) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature.* **452**, 176-180.
- Kaminsky R, Gauvry N, Schorderet Weber S, Skripsky T, Bouvier J, Wenger A and al.** (2008b) Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol Res.* **103**, 931-939.
- Kaplan RM.** (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* [en-ligne] **20**(10), 477-481.
[<http://67.212.230.121/>] (consulté le 02/09/2011)
- Kenyon F, Greer AW, Coles GC, Cringoli G, Papadopoulos E, Cabaret J and al.** (2009) The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology.* **164**, 3-11.
- Kidane A, Houdijk JGM, Athanasiadou S, Tolkamp BJ, Kyriazakis I.** (2010) Effects of maternal protein nutrition and subsequent grazing on chicory (*Cichorium intybus*) on parasitism and performance of lambs. *J. Anim. Sci.* [en-ligne] **88**, 1513-1521. [<http://jas.fass.org/content/88/4/1513.full>] (consulté le 30/08/2011)
- Knox MR, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ.** (2006) Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* **139**, 385-393.
- Kondamudi N, Mohapatra SK, Misra M.** (2008) Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *J. of Agricultural and Food Chemistry.* **56**(24), 11757-11760.
- Lange KC, Olcott DD, Miller JE, Mosjidis JA, Terrill TH, Burke JM and al.** (2006) Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Vet. Parasitol.* **141**(3-4), 273-278.
- Learmount J, Taylor MA, Smith G, Morgan C.** (2006) A computer model to simulate control of parasitic gastroenteritis in sheep on UK farms. *Vet. Parasitol.* **142**, 312-329.

Lee BH, Clothier MF, Dutton FE, Nelson SJ, Johnson SS, Thompson DP and al. (2002) Marcfortine and paraherquamide class of anthelmintics: discovery of PNU-141962. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **2**, 779–793.

Little PR, Hodge A, Maeder SJ, Wirtherle NC, Nicholas DR, Cox GG and al. (2011) Efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Veterinary Parasitology*. **181**, 180–193.

Mahieu M, Arquet R, Kandassamy T, Mandonnet N, Hoste H. (2007) Evaluation of targeted drenching using Famacha method in Creole goat: reduction of anthelmintic use, and effects on kid production and pasture contamination. *Vet. Parasitol.* **146**(1-2), 135–147.

Makkar, HPS. (2003) Quantification of tannins in tree and shrub foliage, A laboratory manual. Kluwer Academic Publishers, International Atomic Energy Agency, 102 p.

Marie-Magdeleine C., Boval M, Philibert L, Borde A, Archimède H. (2010a) Effect of banana foliage (*Musa x paradisiaca*) on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Livestock Science*. **131**(2-3), 234–239.

Marie-Magdeleine C, Mahieu M, Philibert L, Despois P, Archimède H. (2010b) Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition parasite infection and growth of lambs. *Small Rumin. Res.* **93**, 10–18.

Marie-Magdeleine C, Udino L, Philibert L, Bocage B, Archimède H. (2010c) *In vitro* effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. **173**(1-2), 85–92.

Marley CL, Cook R, Keatinge R, Barrett J, Lampkin NH. (2003) The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Chicorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Vet. Parasitol.* **112**(1-2), 147–155.

Martínez-Ortíz-de-Montellano C, Vargas-Magaña JJ, Canul-Ku HL, Miranda-Soberanis R, Capetillo-Leal C, Sandoval-Castro CA and al. (2010) Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.* **172**, 283–290.

Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Vargas-Magaña JJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro CA, Cob-Galera L, May-Martínez M and al. (2007) Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles improves the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. *Vet. Parasitol.* **146**, 66–76.

Max RA. (2010) Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. *Vet Parasitol.* **169**, 138–43.

Méndez-Ortíz FA, Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta JFJ. Feed intake, diet digestibility, and faecal excretion of *Haemonchus contortus* eggs in hair sheep fed *Havardia albicans* rich fodder. *Small Ruminant Research*. A paraître.

Mc Arthur C, Hagerman AE, Robbins CT. (1991) Physiological strategies of mammalian herbivores against plant defense. *In: Plant defenses against mammalian herbivory*. Palo et Robbins (Eds.), Boston, London, 103-114.

McNiven M, Flipot P, Summers JD, Leeson D. (1977) The feeding value of spent coffee grounds for ruminants. *Nutr. Abstr. Rev.* **47**, 5449.

Min BR and Hart SP. (2003) Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*. [en-ligne] **81**(E. Suppl. 2), E102-E109.
[<http://www.asas.org/symposia/03esupp2/jas2418.pdf>] (consulté le 22/04/2011)

Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC. (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.

Minho AP, Bueno ICS, Louvandini H, Jackson F, Gennari SM, Abdalla AL. (2008) Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Animal Feed Science and Technology*. **147**, 172-181.

Molan AL, Waghorn GC, Min BR, Mc Nabb WC. (2000) The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitol.* **47** (1), 39-44.

Molan AL, Waghorn GC, Mc Nabb WC. (2002) Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis in vitro*. *Vet. Rec.* **150** (3), 65-69.

Molan AL, Meagher LP, Spencer PA, 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 AL, Sivakumaran S, Spencer PA, Meagher LP. (2004) Green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins inhibit the motility of infective larvae of *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis in vitro*. *Res. Vet. Sci.* **77**, 239-243.

Montalvo-Aguilar X, López-Arellano M.E, Vázquez-Prats V, Liébano-Hernández E, Mendoza de Guives P. (2006) Resistencia antihelmíntica de nemátodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noreste del estado de Tlaxcala. *Tecnica Pecuaria México*. **44**, 81-90.

Morgan DE et Trinder N. (1980) The composition and nutritional value of some tropical and sub-tropical by-products. *In: By-products and wastes in animal feeding*. BSAP Occasional Publication n° 3. BSAP, Reading, Great Britain, 91-111.

Mueller-Harvey I. (2006) Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **86**(13), 2010-2037.

NCR-SARE. North Central Region_Sustainable Agriculture Research & Education. *Famacha demo*. [en-ligne] Mise en ligne 2010.
[<http://www.northcentralsare.org/>] (consulté le 13/12/11)

Nieves-Guerrero A, Torres-Acosta JFJ, Hoste H, Sandoval-Castro C, Cámara-Sarmiento R, Alonso-Díaz MA. (2009) Evaluación de fuentes de taninos provenientes de sustratos agroindustriales (cacao y café) en el control de *Haemonchus contortus* en ovinos. In: Memoria VIII. Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Mérida, Yucatán, México.

Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WA, Waghorn GC. (1995) Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either Lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *J. Agric. Sci.* **125**, 281-289.

Niezen JH, Robertson HA, Waghorn G, Charleston WA. (1998a) Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Vet. Parasitol.* **80**(1), 15-27.

Niezen JH, Waghorn G, Charleston WA. (1998b) Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed Lotus (*L. pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Vet. Parasitol.* **78**, 13-21.

Niezen JH, Charleston WAG, Robertson HA, Shelton ID, 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. *Vet. Parasitol.* **105**, 229-245.

O'Connor LJ, Walkden-Brown SW, Kahn LP. (2006) Ecology of the free living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet. Parasitol.* **142**, 1-15.

Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JFJ, Ayala-Burgos AJ, Sandoval-Castro CA, Valero-Coss RO, Mendoza-de-Gives P. (2009) Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Vet. Res.* [en-ligne] **5**, 46. [<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/5/46>] (consulté le 25/09/2011)

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**(1), 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. *Vet. Parasitol.* **127**(3-4), 277-283.

Parsons D, Calderón-Quintal A, Nicholson CF, Blake RW, López-Cervantes C, Torres-Acosta F and al. (2006) Diagnóstico y necesidades de investigación en los sistemas de producción ovinos en Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, Mexico.

Pérez-Martínez M, Caemmerer B, De Peña MP, Cid C, Kroh LW. (2010) Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* **58**(5), 2958-2965.

Pomroy WE and Adlington BA. (2006) Efficacy of short-term feeding of sulla (*Hedysarum coronarium*) to young goats against a mixed burden of gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* **136**(3-4), 363-366.

- Price ML, Van Scoyoc S, Buttler LG.** (1978) A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1214.
- Ramalakshmi K, Rao LJM, Takano-Ishikawa Y, Goto M.** (2009) Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry.* **115**(1), 79-85.
- Ramírez-Restrepo CA and Barry TN.** (2005) Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *An. Feed Sci. Technol.* **120**(3-4), 179-201.
- Ramirez-Coronel MA, Marnet N, Kumar Kolli VS, Roussos S, Guyot S, Augur C.** (2004) Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-HPLC. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1344-1349.
- Reyes R.** (1993) Determinacion de compuestos fenolicos por difusión radial derivado del método de Hagerman. UADY, FMVZ, Laboratorio de Nutricion Animal, Yucatán, Mexico.
- Robin MM.** (2011) Notre poison quotidien: La responsabilité de l'industrie chimique dans l'épidémie des maladies chroniques. Editions La Découverte, 478p.
- Rodríguez-Vivas RI y Cob-Galera LA.** (2005) Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria - Segunda edición. Mérida, Yucatán, México : Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, 309 p.
- Rojas DK, Lopez J, Tejada I, Vazquez V, Shimada A, Sanchez D and al.** (2006) Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. *An. Feed Sci. Technol.* **128**, 218-228.
- Sanger NC and Gill J.** (1999) Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology Today.* **15**(4), 141-146.
- Shaik SA, Terrill TH, Miller JE, Kouakou B, Kannan G, Kaplan RM and al.** (2006) Sericea lespedeza hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* **139**(1-3), 150-157.
- Sikka SS, Bakshi MPS, Ichhponani JS.** (1985) Evaluation *in vitro* of spent coffee grounds as a livestock feed. *Agric. Wastes.* **13**, 315-17.
- Smith WD and Zarlenga DS.** (2006) Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology.* **139**(4), 347-359.
- Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB, Barry TN.** (1992) Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. *J. Sci. Food. Agric.* **58**, 321-329.
- Terrill TH, Mosjidis J, Moore DA, Shaik SA, Miller D, Burke JM and al.** (2007) Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* **146**(1-2), 117-122.

Thamsborg SM, 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.

Torres-Acosta JFJ and Hoste H. (2008) Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*. **77**(2-3), 159-173.

Torres-Acosta JFJ, Dzul-Canche R, Aguilar-Caballero A, Rodríguez-Vivas I. (2003a) Prevalence of gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles in sheep herds of Yucatán, Mexico. *Veterinary Parasitology*. **114**, 33-42.

Torres-Acosta JFJ, Roberts B, Canto-Dorantes J, Martínez-Ortíz de Montellano C, Rodríguez J, Canul-Ku HL and al. (2003b) Prevalence of sheep herds with gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles, imidazothaisoles and macrocyclic lactones in Yucatán. *In: Proceedings of the V International Seminar in Animal Parasitology*, 48-52.

Torres-Acosta JFJ, Villaroel-Alvarez MS, Rodríguez-Arevalo FJ, Gutiérrez-Segura I, Alonso-Díaz MA. (2003c) Diagnóstico de nemátodos gastrointestinales resistentes a benzimidazoles e imidazotiazoles en un rebaño caprino de Yucatán, México. *Revista Biomedicina*. **14**, 75-81.

Torres-Acosta JFJ, Jacobs D, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro C, May-Martinez M, Cob-Galera LA. (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. *Vet. Parasitol.* **124**, 217–238.

Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero A, Le Bigot C, Hoste H, Canul-Ku HL, Santos-Ricalde R and al. (2005) Comparing different formulae to test gastrointestinal nematode resistance to benzimidazoles in smallholder goat farms in Mexico. *Veterinary Parasitology*. **134**, 241-248.

Torres-Acosta JFJ, Jacobs D, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro C, Cob-Galera LA, May-Martinez M. (2006) Improving resilience against natural gastrointestinal nematode infections in browsing kids during the dry season in tropical Mexico. *Vet. Parasitol.* **135**, 163–173.

Torres-Acosta JFJ, Cámara-Sarmiento R, Aguilar-Caballero AJ, Canul-Ku HL, Pérez-Cruz M. (2009) Estrategias de desparasitación selectiva dirigida. *In: Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico*. Universidad Autónoma de Chapingo, C.R.U.S.E. Tabasco, México, 50-62.

Tzamaloukas O, Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. (2005) The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. *Int. J. Parasitol.* **35**(3), 329-335.

van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. (1991) Methods for dietary neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**, 3583-3597.

van Wyk JA and Bath GF. (2002) The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Vet. Res.* **33**(5), 509-529.

Vatta AF, Letty BA, van der Linde MJ, van Wijk EF, Hansen JW, Krecek RC. (2001) Testing for clinical anaemia caused by *Haemonchus spp.* In goats farmed under resource-poor conditions in South Africa using an eye colour chart developed for sheep. *Vet. Parasitol.* **99**(1), 1-14.

von Samson-Himmelstjerna G, von Witzendorff C, Sievers G, Schnieder T. (2002) Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta-tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. *Vet. Parasitol.* **108**(3), 227-235.

von Samson-Himmelstjerna G, Coles GC, Jackson F. (2009) Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research.* **105**, 825-834.

Waghorn G and Mc Nabb WC. (2003) Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* **62**, 383-392.

Waghorn TS, Molan AL, Deighton M, Alexander RA, Leathwick DM, Mc Nabb WC and al. (2006) *In vivo* anthelmintic activity of *Dorycnium rectum* and grape seed extract against *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *N. Z. Vet. J.* **54**(1), 21-27.

Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitology.* [en-ligne] **20**(10), 469-476. [<http://francais.mcgill.ca/>] (consulté le 13/05/2011)

Xu CC, Cai Y, Zhang JG, Ogawa M. (2007) Fermentation quality and nutritive value of a total mixed ration silage containing coffee grounds at ten or twenty percent of dry matter. *Journal of Animal Science.* [en-ligne] **85**(4), 1024-1029. [<http://jas.fass.org/content/85/4/1024.full.pdf+html>] (consulté le 27/05/2011)

ANNEXES

Annexe 1. Résultats détaillés du test d'éclosion des œufs.

Annexe 2. Constitution des groupes selon les données récoltées préalablement au démarrage de l'expérience *in vivo*.

Annexe 3. Résultats du suivi de l'excrétion fécale des œufs de nématodes gastro-intestinaux.

Annexe 1. Resultados detallados del test d'éclosion des œufs.

Extracto TAZZA VERA CRUZ					
	% Eclosion			% Inhib Eclosion 2400	% Inhib Control
	Control	2400 µg/mL	2400 Correccion		
Placa 1	97,2	12,3	13,0	87,0	2,8
	93,6	3,5	3,7	96,3	6,4
	94,1	3,7	3,9	96,1	5,9
95,0					
Placa 2	91,4	8,8	9,7	90,3	8,6
	89,8	9,4	10,4	89,6	10,2
	90,1	8,7	9,6	90,4	9,9
90,4			Promedio	91,6	7,3
			DE	3,7	2,8

Extracto TAZZA OAXACA					
	% Eclosion			% Inhib Eclosion 2400	% Inhib Control
	Control	2400 µg/mL	2400 Correccion		
Placa 1	96,0	20,8	22,0	78,0	4,0
	93,4	71,2	75,4	24,6	6,6
	94,1	42,3	44,8	55,2	5,9
94,5					
Placa 2	93,7	24,9	27,0	73,0	6,3
	93,2	66,8	72,5	27,5	6,8
	89,7	33,6	36,4	63,6	10,3
92,2			Promedio	53,7	6,6
			DE	22,8	2,0

Extracto TAZZA CHIAPAS					
	% Eclosion			% Inhib Eclosion 2400	% Inhib Control
	Control	2400 µg/mL	2400 Correccion		
Placa 1	93,7	5,0	5,2	94,8	6,3
	95,9	4,8	5,0	95,0	4,1
	97,7	3,4	3,5	96,5	2,3
95,8					
Placa 2	91,5	6,5	7,1	92,9	8,5
	91,4	16,9	18,6	81,4	8,6
	90,7	10,0	11,0	89,0	9,3
91,2			Promedio	91,6	6,5
			DE	5,6	2,8

Extracto INTER Decaf					
	% Eclosion			% Inhib Eclosion 2400	% Inhib Control
	Control	2400 µg/mL	2400 Correccion		
Placa 1	85,1	8,4	10,7	89,3	14,9
	71,4	1,7	2,2	97,8	28,6
	78,6	10,0	12,8	87,2	21,4
78,4					
Placa 2	90,8	12,5	13,8	86,2	9,2
	93,2	17,2	19,0	81,0	6,8
	87,5	16,3	18,0	82,0	12,5
90,5			Promedio	87,3	15,6
			DE	6,1	8,1

Annexe 1. Résultats détaillés du test d'éclosion des œufs (suite).

Extracto Starbucks SG					
	% Eclosion			% Inhib Eclosion 2400	% Inhib Control
	Control	2400 µg/mL	2400 Correccion		
Placa 1	94,2	59,4	63,4	36,6	5,8
	92,9	21,8	23,3	76,7	7,1
	93,8	6,0	6,5	93,5	6,3
93,6					
Placa 2	91,4	1,6	1,7	98,3	8,6
	97,4	2,8	2,9	97,1	2,6
	97,5	3,7	3,9	96,1	2,5
95,4			Promedio	92,4	5,5
			DE	8,9	2,4

Extracto Starbucks CS					
	% Eclosion			% Inhib Eclosion 2400	% Inhib Control
	Control	2400 µg/mL	2400 Correccion		
Placa 1	90,0	80,3	88,8	11,2	10,0
	88,9	72,2	79,8	20,2	11,1
	92,3	68,7	76,0	24,0	7,7
90,4					
Placa 2	94,5	1,7	1,8	98,2	5,5
	95,5	2,0	2,1	97,9	4,5
	94,0	5,1	5,3	94,7	6,0
94,7			Promedio	57,7	7,5
			DE	43,2	2,6

Extracto GARAT					
	% Eclosion			% Inhib Eclosion 2400	% Inhib Control
	Control	2400 µg/mL	2400 Correccion		
Placa 1	93,6	7,2	7,8	92,2	6,4
	93,1	52,7	56,9	43,1	6,9
	91,0	7,0	7,6	92,4	9,0
92,6					
Placa 2	95,3	6,4	6,7	93,3	4,7
	93,7	8,7	9,2	90,8	6,3
	95,0	4,1	4,4	95,6	5,0
94,7			Promedio	92,8	6,4
			DE	1,8	1,5

Extracto GARAT Decaf					
	% Eclosion			% Inhib Eclosion 2400	% Inhib Control
	Control	2400 µg/mL	2400 Correccion		
Placa 1	95,1	1,7	1,8	98,2	4,9
	96,2	3,0	3,1	96,9	3,8
	95,9	1,4	1,5	98,5	4,1
95,7					
Placa 2	91,0	7,2	7,8	92,2	9,0
	91,7	8,1	8,7	91,3	8,3
	95,0	7,1	7,7	92,3	5,0
92,6			Promedio	94,9	5,8
			DE	3,3	2,2

Annexe 2. Constitution des groupes selon les données récoltées préalablement au démarrage de l'expérience *in vivo*.

Grupo	Identification animal	Edad (años)	Peso (kg) (J0)	FAMACHA	Condicion Corporal	HPG (J-1)
1 boucle jaune 100% concentré	3118	8	33,0	3	1,5	300
	4112	7	34,0	3	2	250
	4076	7	33,2	3	2	200
	4102	7	31,6	3	2	700
	4107	7	45,2	4	2	250
	7183	4	31,6	3	2,5	200
Promedio		6,7	34,8			317
DE		1,4	5,2			191

2 boucle verte 15% café	5013	6	35,4	3	2	500
	6057	5	30,4	4	1,5	250
	5078	6	39,6	2	1,5	200
	4093	7	42,4	4	1,5	300
	3106	8	30,4	4	2	400
	3001	8	33,8	3	1,5	150
Promedio		6,7	35,3			300
DE		1,2	4,9			130

3 boucle rouge 30% café	3006	8	39,6	3	2	200
	3070	8	32,2	3	1,5	450
	3043	8	37,8	4	2,5	300
	5095	6	36,0	3	2	400
	4101	7	39,6	3	2	200
	5036	6	33,0	3	2	150
Promedio		7,2	36,4			283
DE		1,0	3,2			121

Promedio general		6,8	35,5			300
DE general		1,2	4,3			142

Annexe 3. Résultats du suivi de l'excrétion fécale des œufs de nématodes gastro-intestinaux (OPG).

Grupo	Numero animal	HPG							
		D-1 (30jun)	D5 (6jul)	D8 (9jul)	D11 (12jul)	D14 (15jul)	D17 (18jul)	D19 (20jul)	D21 (22jul)
1	3118	300	250	100	150	300	100	150	100
	4112	250	300	200	300	100	250	950	650
	4076	200	100	100	150	150	400	250	200
	4102	700	300	550	1000	600	1500	1400	1200
	4107	250	300	450	500	1050	2000	1500	1400
	7183	200	150	350	400	200	600	400	650
	Promedios	317	233	292	417	400	808	775	700
	DE	191	88	188	317	365	764	592	521

2	5013	500	200	500	250	250	800	850	600
	6057	250	150	250	150	250	500	650	500
	5078	200	250	50	100	300	350	350	600
	4093	300	150	150	250	150	500	300	700
	3106	400	100	250	550	550	300	200	300
	3001	150	300	350	150	350	350	400	300
	Promedios	300	192	258	242	308	467	458	500
	DE	130	74	156	163	136	183	244	167

3	3006	200	300	500	200	350	250	300	200
	3070	450	450	50	600	550	450	600	600
	3043	300	350	150	450	450	350	750	300
	5095	400	150	100	50	50	200	250	350
	4101	200	150	350	650	400	400	400	250
	5036	150	350	350	300	1000	1100	1250	1050
	Promedios	283	292	250	375	467	458	592	458
	DE	121	120	176	234	311	328	373	322

LE MARC DE CAFÉ COMME SOURCE ATYPIQUE DE TANINS CONDENSÉS DANS LE CONTRÔLE INTÉGRÉ DES NÉMATODES GASTRO-INTESTINAUX CHEZ LES PETITS RUMINANTS DU YUCATÁN, MEXIQUE

NOM et Prénom : LECASBLE Côme

RÉSUMÉ

Les plantes bioactives aux propriétés anthelminthiques (ATH) représentent une alternative prometteuse aux traitements chimiques. L'effet ATH *in vitro* du marc de café *Coffea arabica* a été récemment montré sur la migration larvaire de *Haemonchus contortus*. Dans un premier temps, la variabilité de l'effet ATH de huit extraits acétoniques lyophilisés de marc de *C. arabica* fut étudiée *in vitro* sur *H. contortus*, en utilisant le test d'éclosion des œufs. Seuls les résultats de la concentration 2 400 µg/mL PBS purent être interprétés, montrant une inhibition marquée et significative de l'éclosion des œufs pour tous les extraits. Le rôle des tanins dans l'effet observé ne fut pas confirmé par l'emploi d'un inhibiteur. Une étude *in vivo* en conditions d'infestation naturelle fut par la suite mise en place afin d'évaluer l'effet de l'inclusion de marc de *C. arabica* dans l'alimentation de chèvres adultes Criollo sur la consommation, la santé et l'excrétion parasitaire des caprins. Dix-huit animaux, pâturant par ailleurs le matin dans la forêt tropicale, furent répartis en trois groupes (contrôle, 15% café, 30% café) et supplémentés pendant 21 jours avec 300 g d'aliments constitués de grains de sorgho, soja et café en proportions variables. La consommation volontaire et l'état général furent surveillés quotidiennement, le poids enregistré à J0 et J21, l'excrétion fécale des œufs de nématodes mesurée à J-1, J5, J8, J11, J14, J17, J19 et J21. Le marc n'a pas eu d'effet antiphysiologique apparent sur les animaux. Bien qu'une réduction de 25 et 27% du nombre d'œufs par gramme fut observée chez les groupes traités, la différence ne fut toutefois pas significative par rapport au contrôle ($P > 0,05$), ceci s'expliquant probablement par la petite taille des échantillons ou la faible teneur en tanins des aliments proposés. L'activité ATH et la sécurité d'emploi du marc de *C. arabica* demandent toujours à être confirmées *in vivo* avant de pouvoir l'utiliser dans le contrôle des nématodes gastro-intestinaux des petits ruminants.

Mots-clés : MARC DE CAFÉ ; TANIN CONDENSÉ ; NÉMATODE GASTRO-INTESTINAL ; TEST D'ÉCLOSION DES ŒUFS ; PETIT RUMINANT ; YUCATÁN ; MEXIQUE.

JURY :

Président : Pr

Directeur : Dr. Radu Gheorghe BLAGA

Assesseur : Pr Barbara DUFOUR

SPENT COFFEE GROUNDS AS A NON-TYPICAL SOURCE OF CONDENSED TANNINS FOR THE INTEGRATED CONTROL OF GASTROINTESTINAL NEMATODES IN SMALL RUMINANTS OF YUCATÁN, MÉXICO

SURNAME: LECASBLE

Given name: Côme

SUMMARY

Bioactive plants with anthelmintic (AH) properties represent a promising alternative to chemical treatments. The *in vitro* AH effect of *Coffea Arabica* spent coffee grounds (SPG) was recently confirmed on *Haemonchus contortus* using the larval migration inhibition test. First, the variability of AH effect of eight SPG acetonetic lyophilized extracts was studied on *H. contortus* using *in vitro* egg hatch test. Results were interpretable at 2 400 µg/mL PBS concentration alone, all the extracts showing a marked and significant inhibition effect on egg hatching. Tannins role in the observed effect was not confirmed using a specific inhibitor. Then an *in vivo* study was implemented in order to evaluate the effects of *C. arabica* SPG inclusion in adult Criollo goats ration on consumption, health and parasitic excretion. Eighteen naturally infected animals browsing daily in the tropical forest were allocated to three groups (control, 15% SPG, 30% SPG) and supplemented with 300 g of feeds constituted with different proportions of sorghum, soya and coffee grounds. Voluntary consumption and general health parameters were monitored daily; weight was registered on D0 and D21; nematode egg excretion was measured on D-1, D5, D8, D11, D14, D17, D19 and D21. SPG had no anti physiological visible effect on animals. Although the faecal egg excretion was reduced by 25 and 27% in the treated groups, no significant difference was encountered in comparison with the control ($P>0,05$). The latter is probably related to the limited sample sizes or to the small concentrations of tannins contained in the offered diets. If *C. Arabica* SPG are to be used for gastrointestinal nematodes control in small ruminant production systems, their security and AH activity still need to be confirmed with *in vivo* further studies.

Keywords: SPENT COFFEE GROUND ; CONDENSED TANNIN ; GASTROINTESTINAL NEMATODE ; EGG HATCH TEST ; SMALL RUMINANT ; YUCATÁN ; MÉXICO.

JURY:

President: Pr

Director: Dr Radu Gheorghe BLAGA

Assessor: Pr Barbara DUFOUR